

Dissertation

" Charakterisierung von Varianten des anti-c-myc-Antikörpers 9E10 mit Keimbahngen-orientierten Aminosäureaustauschen "

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biochemikerin Kristina Zubow
geboren am 03.02.1976 in Simferopol (Krim)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Höhne
2. Prof. Dr. Burkhard Mischeel
3. Prof. Dr. Stefan Dübel

eingereicht: 10.07.2006

Datum der Promotion: 08.01.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	4
2	Zusammenfassung.....	7
3	Einleitung	9
3.1	<i>Das Adaptive Immunsystem.....</i>	<i>11</i>
3.1.1	Reifung der B-Lymphozyten.....	12
3.2	<i>Antikörper.....</i>	<i>15</i>
3.2.1	Struktur und Funktion	16
3.2.2	Molekulare Basis der Antikörper-Antigen-Erkennung	18
3.2.3	Antikörperdesign.....	22
3.3	<i>Der anti-c-myc-Peptid-Antikörper 9E10.....</i>	<i>24</i>
3.4	<i>Die Affinitätsreifung von Antikörpern</i>	<i>27</i>
3.4.1	Die hypervariable CDR-H3.....	32
3.5	<i>Peptidspot-Analysen.....</i>	<i>39</i>
4	Zielstellung.....	42
5	Material und Methoden	43
5.1	<i>Material.....</i>	<i>43</i>
5.1.1	Chemikalien	43
5.1.2	Lösungen, Puffer und Nährmedien für Arbeiten mit <i>E. coli</i>	45
5.1.3	Puffer und Lösungen für Proteinexperimente	46
5.1.4	Puffer und Lösungen für DNA-Experimente	49
5.1.5	Synthetische Oligonukleotide	50
5.1.6	Synthetische Peptide	52
5.1.7	Plasmid und Bakterienstämme	52
5.1.8	Kits, Proteine und sonstige Substanzen.....	53
5.2	<i>Methoden.....</i>	<i>54</i>
5.2.1	Herstellung der 9E10-Rückmutanten	54

5.2.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR	54
5.2.1.2	Ligation in pASK85-9E10	60
5.2.1.3	Transformation in superkompetente XL-1-Zellen	60
5.2.1.4	Selektion der mutierten DNA.....	61
5.2.1.5	Sequenzierung der DNA	62
5.2.2	Präparative Fab-Synthese in <i>E. coli</i>	62
5.2.2.1	Fab-Expression.....	62
5.2.2.2	Fab-Isolierung aus dem Periplasma	63
5.2.2.3	In vitro Fab-Rückfaltung.....	63
5.2.3	Reinigung von Fab mittels Metallaffinitätschromatographie.....	64
5.2.4	Biochemische Charakterisierung von 9E10-Fab und Rückmutanten	65
5.2.4.1	Peptidspot-Analysen.....	65
5.2.4.2	K _D -Bestimmung im ELISA.....	67
5.2.4.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten und K _D mittels SPR	68
5.2.5	Modellierung der Bindung des c-myc(410-427)-Peptides an 9E10.....	69
5.2.6	Standardmethoden	70
5.2.7	Keimbahnsequenzanalyse mit Datenbanken	71
5.2.8	Programm für Moleküldarstellungen	72
6	Ergebnisse	73
6.1	Identifizierung der Keimbahngene zu 9E10.....	73
6.2	Verteilung der somatischen Mutationen im 9E10 und Auswahl der Einzelrückmutanten.....	77
6.3	Epitopverlängerung und Modellierung der Bindung an 9E10.....	78
6.4	Mutagenesestudien an 9E10 und bakterielle Fab-Expression in <i>E. coli</i>	80
6.5	Reinigung der Fab-Fragmente.....	85
6.6	Biochemische Charakterisierung von 9E10-Fab und Keimbahnrückmutanten.....	87
6.6.1	Charakterisierung der Bindungskonstanten an c-myc-Peptide	88
6.6.1.1	Bestimmung von K _D im ELISA	88
6.6.1.2	Bestimmung von K _D und der kinetischen Konstanten k _{on} und k _{off} mit SPR	93
6.6.2	Charakterisierung der Bindungsspezifität	100
6.6.2.1	Substitutionsanalysen an c-myc-Peptiden.....	100
6.6.2.2	Längenanalysen am c-myc-Peptid	118

6.6.2.3	Kreuzreaktivitätsanalysen mit homologen myc-Peptiden.....	120
7	Diskussion	122
7.1	<i>Identifizierung der Keimbahngene zu 9E10</i>	<i>122</i>
7.2	<i>Bakterielle Expression von 9E10-Fab und Rückmutanten.....</i>	<i>123</i>
7.3	<i>Charakterisierung der Bindungseigenschaften von 9E10-Fab.....</i>	<i>125</i>
7.4	<i>Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Rückmutanten</i>	<i>133</i>
7.4.1	Einfluss von Einzelmückmutationen auf die Bindungseigenschaft.....	133
7.4.1.1	Die Einzelmückmutationen H ^{H31} S, R ^{H53} G und G ^{H52} S	133
7.4.1.2	Die neutrale Einzelmückmutation H ^{H58} Y	139
7.4.1.3	Die Einzelmückmutationen S ^{H100h} Y sowie F ^{L30} I und T ^{L91} S	140
7.4.2	Einfluss der rücmucktierten V-Domänen auf die Bindungseigenschaft	144
7.4.3	Bindungseigenschaft der 9E10-Keimbahngenrückmutante	150
7.5	<i>Fazit der Affinitätsreifung von 9E10</i>	<i>155</i>
7.6	<i>Fehlerbetrachtung der Peptidspot-Analysen</i>	<i>159</i>
	Literaturverzeichnis.....	161
	Danksagung.....	174
	Eidestättliche Erklärung.....	175

1 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Amp	Ampecillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
aTc	Anhydrotetracyclin
bp	Basenpaare
C	konstant (<i>constant</i>)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
cfu	<i>colony forming units</i>
C _H 1	erste konstante Domäne der schweren Kette des Antikörpers
C _L	konstante Domäne der leichten Kette des Antikörpers
D	divers
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	Fab-Fragment (variabler Bereich der Antikörperstruktur)
Fc	Fc-Fragment (konstanter Bereich der Antikörperstruktur)
FR	Gerüstregion (<i>framework region</i>)
Gnd-HCl	Guanidin-Hydrochlorid
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HBS	HEPES gepufferte Kochsalzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
J	verknüpfen (<i>joining</i>)
k_a / k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
K_A	Gleichgewichtsassoziationskonstante
k_d / k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
mAk	molekularer Antikörper
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MP	Magermilchpulver
MWCO	Molekulargewichtsausschluß (<i>molecular weight cut off</i>)
OD	optische Dichte
<i>OmpA</i>	<i>outer membrane protein A</i>
<i>OmpT</i>	<i>outer membrane protease</i>
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>PhoA</i>	Alkalische Phosphatase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit (<i>resonance unit</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOC	Derivat von SOB (<i>super optimal broth</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat, EDTA (<i>EDTA tris borat buffered solution</i>)
TE	Tris-EDTA (<i>EDTA tris buffered solution</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalslösung mit Tween (<i>tween tris buffered saline</i>)
V	variabel
v/v	Volumenteile pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
v/w	Volumenteile pro Gewicht (<i>volume per weight</i>)
V _H	variable Domäne der schweren Kette des Antikörpers
V _L	variable Domäne der leichten Kette des Antikörpers
ZK	Zellkultur

2 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Affinitäts- und Spezifitätsreifung des murinen anti-c-myc-Antikörpers 9E10. Hierfür sollten Keimbahnrückmutanten des 9E10 gentechnisch hergestellt und in ihrem Bindungsverhalten zum 11-mer myc-tag-Peptid (EQKLISEEDLN) und einer verkürzten 8-mer Variante des Epitopes (KLISEEDL) charakterisiert werden.

Die murinen Gensegmente VH3.3:39, DFL16.1 und JH4 sowie 21.2* und J1 konnten als die Keimbahngensegmente zu 9E10 identifiziert werden. Insgesamt wurden sieben Einzelrückmutanten in den CDRs H1, H2, H3, L1 und L3, zwei komplette Rückmutanten jeweils der V_H- bzw. V_L-Domäne und eine komplette 9E10-Rückmutante mit insgesamt zwanzig Aminosäureaustauschen charakterisiert. Es ist gelungen die Keimbahnrückmutanten des 9E10-Antikörpers als funktionelles Fab in *E. coli* zu exprimieren, wobei das Protein sowohl aus der periplasmatisch löslichen Fraktion als auch durch Rückfaltung aus *inclusion bodies* erhalten werden konnte.

Es wurde festgestellt, dass das 9E10-Fab an ein längeres c-myc-Peptid mit der Sequenz A⁴⁰⁸EEQKLISEEDLLRKRR⁴²⁷ mit 750-fach höherer Affinität ($K_D = 1,2 \pm 0,3$ nM, bestimmt mit der SPR-Methode) als an das kürzere 11-mer myc-tag-Peptid bindet. Das Keimbahngen-kodierte 9E10-Fab weist keine mit den hier untersuchten Methoden nachweisbare Bindung an das 11-mer myc-tag-Peptid und das verkürzte 8-mer Peptid auf. Es konnte jedoch eine Bindung des Keimbahngen-kodierten 9E10-Fabs zum immobilisierten 20-mer c-myc(408-427)-Peptid mit einer Dissoziationskonstante K_D von $3,93 \pm 0,04$ μ M (SPR) bestimmt werden. Längenanalysen am myc-Peptid zeigen, dass die Affinitätszunahme zum 20-mer Peptid auf die Verlängerung des C-Terminus zurückzuführen ist. Mit Hilfe der Substitutionsanalysen am 20-mer c-myc(408-427)-Peptid wurde das vom 9E10 erkannte Epitop um vier Aminosäuren (420-423) auf die Sequenz E⁴¹⁰QKLISEEDLLRK⁴²³ und die darin sehr selektiv erkannten Schlüsselpositionen um L⁴¹⁹ auf L⁴¹³ISEXXL⁴¹⁹ erweitert. In einem Strukturmodell wird die Konformation des verlängerten C-Terminus des gebundenen Peptides als eine sich fortsetzende α -Helix vorgeschlagen.

Durch die Charakterisierung der Bindung der 9E10-Keimbahnrückmutanten an myc-Peptide unterschiedlicher Affinität konnten selbst geringe Auswirkungen der Rückmutationen auf die Affinität und Spezifität analysiert werden. Der ca. 3300-fache (SPR) Affinitätsgewinn zum

immobilisierten 20-mer c-myc(408-427)-Peptid während der 9E10-Affinitätsreifung kommt durch eine Zunahme der Assoziations- und Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes zustande, wobei die Änderungen in der Assoziationsgeschwindigkeit überwiegen. Die Reifung der V_H-Domäne hat den größeren Effekt auf den Assoziationsprozess, während die der V_L-Domäne stärker die Dissoziation beeinflusst. Rückmutationen in der V_H-Domäne führen sowohl zu einem Affinitäts- als auch zu einem Spezifitätsverlust des 9E10-Antikörpers. Die CDR-H3 trägt einen wesentlichen Beitrag zur Affinitätsreifung. Die V_L-Domäne dient dabei mit der CDR-L1 und -L3 als Bindungsplattform für die lange und flexible CDR-H3 und führt auf diese Weise zu einer höheren Affinität von 9E10. Dabei kommt der längeren CDR-L1 der V_L-Domäne eine neue bedeutende Rolle zu, nämlich die der Stabilisierung der Bindungskonformation der flexiblen CDR-H3-Schleife. Der Affinitätsgewinn während der Reifung des 9E10-Antikörpers resultiert vorrangig nicht aus zusätzlichen Kontakten zum Peptid, sondern vor allem aus der Beeinflussung der Konformation oder der Flexibilität der an der Bindung beteiligten CDRs, insbesondere der CDR-H3 und -H2. Die Einzelmückmutationen der 9E10-Reste, die im direkten Kontakt zum Peptid stehen, bewirken nur einen schwachen Verlust der Selektivität zu einzelnen Positionen im Peptid. Die wesentlichen Wechselwirkungen zum humanen c-myc-Peptid sind im ungereiften 9E10-Fab bereits vorhanden. So ist die selektive Erkennung der Schlüsselpositionen LISEX_{XXL} im humanen c-myc-Peptid im Anfangsstadium der Affinitätsreifung von 9E10 bereits stark ausgeprägt und wird lediglich fein modelliert.

3 Einleitung

Allgemeines

Die Evolution hochaffiner, spezifisch bindender Proteine ist noch weitgehend unerforscht. Um die Evolution von Proteinen verstehen zu können, sucht man nach den jeweiligen Vorläufergenen in verschiedenen Organismen. Die Suche nach solchen Vorläufergenen gestaltet sich jedoch schwierig. Zwar ändern sich Proteinstrukturen im Laufe der Evolution langsam, die genomischen Sequenzen unterliegen jedoch einer schnelleren Änderung. Antikörper sind Immunglobulinproteine mit einer hohen primären Diversität, die von Kiefernäulern aus dem Unterstamm der Wirbeltiere gebildet werden. Um die Evolution von Antikörpern verstehen zu können, wird nach V-Domänen-ähnlichen Immunglobulinkodierenden Genen bei den Wirbellosen gesucht. Antikörper können in einem Organismus jedoch auch eine molekulare Evolution (Affinitätsreifung) durchlaufen. Diese molekulare Evolution in einem Organismus kann anhand bekannter Keimbahnsequenzen, die innerhalb einer Art einen überschaubaren Pool bilden, studiert werden. Bei einem Kontakt mit einem Antigen, können die in den Keimbahnsequenzen kodierten Antikörper mutieren. Dieser Prozess der Antikörperaffinitätsreifung ist Teil einer Antwort des adaptiven Immunsystems auf Krankheitserreger. Die Affinitätsreifung ist auf somatische Hypermutation in den funktionalen Genen der variablen Regionen zurückzuführen. Sie bewirkt nicht nur eine zunehmende Affinität, sondern nach gängiger Meinung auch eine höhere Spezifität des Antikörpers zum Antigen (z.B. Demirel und Lesk, 2005, Wedemayer et al., 1997, Jimenez et al., 2004). Die Entschlüsselung des Genoms und die Sequenzierung der Antikörper kodierenden V-, D- und J-Gensegmente in der Keimbahn verschiedener Organismen lieferten hierzu einen wichtigen Meilenstein. Strukturanalysen von Antikörper-Antigen-Interaktionen können dabei als Modelle für Protein-Protein- bzw. Protein-Ligand-Interaktion dienen. Viele Grundprinzipien der molekularen Erkennung konnten so definiert werden, viele Faktoren bleiben dennoch unverstanden.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich in letzter Zeit mit den molekularen Ursachen für die hohe Affinität und Spezifität von gereiften Antikörpern beschäftigt. Die Herangehensweisen sind unterschiedlich. So werden die Bindungseigenschaften von Antikörpern gegen dasselbe Antigen aus einer primären (Keimbahn-kodiert, moderate Affinität, geringere Spezifität) und

sekundären (viele Mutationen, höhere Affinität, höhere Spezifität) Immunantwort miteinander verglichen (Manivel et al., 2000). Antikörper aus derselben genetischen Linie, isoliert aus unterschiedlichen Stadien der Immunantwort und gegen dasselbe Antigen werden analysiert und Konsensusmutationen identifiziert (Li et al., 2003). Die schrittweise und kombinierte Rückmutation eines gereiften Antikörpers auf die Keimbahngensequenz ist ein gängiger Ansatz zur Studie der Affinitätsreifung von Antikörpern. Auch die Vormutation eines Keimbahngen-kodierten Antikörpers auf die Sequenz des gereiften ist ein oft gewählter Ansatz. Kombiniert man die Daten aus diesen beiden Ansätzen erhält man eine sehr effiziente Methode, um Schlüsselpositionen sowohl für die Änderungen in der Affinität als auch in der Spezifität auszumachen (z.B. Yin et al., 2001). Kooperative Effekte zwischen einzelnen somatischen Mutationen werden untersucht (z.B. Yang und Schultz, 1999). Parallel dazu lässt sich die Kreuzreaktivität und Polyspezifität der Antikörper in den unterschiedlichen Reifungsstadien vergleichen (z.B. Sethi et al., 2006). Eine Vielzahl von Antikörpern gegen Haptene, aber nur wenige gegen Peptide und Proteine wurde bisher studiert. Daneben gibt es Arbeiten zur Reifung von katalytischen Antikörpern und Schwereketten-Antikörpern. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeiten liegt in der Charakterisierung des Einflusses somatischer Mutationen auf die Struktur der Antigenbindungstasche.

Die hohe Variabilität der Antikörper macht sie für neue Anwendungen insbesondere in der Humantherapie interessant. Antikörper und ihre Derivate stellen über 30% der heute in der Entwicklung befindlichen Biopharmazeutika dar (Laffly und Sodoyer, 2005). Der Einsatz von *in vitro* generierten Antikörpern in der Biotechnologie und als Therapeutika gewinnt dabei zunehmend an Bedeutung. Das Wissen über die Reifung von Antikörpern fließt in das Design von Antikörperbibliotheken mit ein. Die Analyse der Affinitätsreifung von Antikörpern würde nicht nur zum Verständnis der spezifischen Antwort des adaptiven Immunsystems auf Krankheitserreger führen, sie könnte zudem einen Beitrag für das Verständnis der Evolution der molekularen Erkennung von Proteinen im Allgemeinen leisten. Dabei ermöglicht die Technologie der Proteinherstellung, kombiniert mit strukturellen, thermodynamischen, kinetischen Analysen und der Charakterisierung von Proteindynamiken, das Studium von molekularen Erkennungen.

3.1 Das Adaptive Immunsystem

Die Evolution des Immunsystems bot den Wirbeltieren zum Überleben in einer artenreichen Umgebung einen hocheffizienten Verteidigungsmechanismus gegen Krankheitserreger. Ähnliche Systeme findet man auch bei Wirbellosen. So besitzen Insekten zelluläre Abwehrmechanismen, bilden Lysozym und sind in der Lage, bei Stimulation Abwehrproteine (*defense proteins*), wie z.B. die bakteriziden Cecropine, zu synthetisieren.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität der Wirbeltiere, die eine allgemeine sofortige Antwort auf Krankheitserreger über phagozytische Zellen und Keimbahn-kodierte Proteine vermittelt, ist die adaptive Immunität spezifischer. Sie ermöglicht eine Anpassung des Organismus an eine Infektion mit sich ändernden Pathogenen durch eine Erkennung nahezu aller biologischen Moleküle. Diese spezifische Antwort ist erworben und wird von nicht Keimbahn-kodierten Rezeptoren, die in immunologischen Zellen gebildet werden, vermittelt. Die adaptive Immunität basiert auf den Reaktionen der im Blut und in der Lymphe zirkulierenden Leukozyten und insbesondere der Lymphozyten, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Es gibt zwei Arten von Lymphozyten: die B- und die T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten reifen nach einer Stimulation zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen aus. Die Antikörper, die Antigene mit hoher Affinität und Spezifität binden, haben eine hohe Diversität, die aus einem begrenzten Pool von Keimbahngenomen, generiert wird. Sie sind eine der Antworten des adaptiven Immunsystems auf eine hohe biologische Diversität von Pathogenen. Bei den T-Lymphozyten unterscheidet man zwischen cytotoxischen T-Zellen und Zellen, die B-Lymphozyten und Makrophagen aktivieren können. Die charakteristischen Merkmale der adaptiven Immunität ist das Vorhandensein von Antikörpern, T-Zellrezeptoren, MHC (*major histocompatibility complex*), RAG (Rekombination-aktivierende Gene) und Gewebe, in denen Lymphozyten entstehen und durch Antigene stimuliert werden. Ein adaptives Immunsystem mit den hier aufgezählten Merkmalen findet man bei Säugern, Vögeln, Reptilien, Amphibien, Knochenfischen und Knorpelfischen. Ihr Ursprung ist auf die Wirbeltiere (Gnathostomata) zurückzuführen (Cannon et al., 2002; Litman et al., 1999). Jüngste Arbeiten mit Neunaugen (exogene Fischparasiten), die zu kieferlosen Wirbeltieren gehören, belegen, dass auch jene eine adaptive Immunität entwickelt haben. Die im Neunauge entdeckten variablen Lymphozytenrezeptoren (VLR= *variable lymphocyte receptor*) zeigen eine somatische Diversität, die denen der Antikörper ähnlich ist (Pancer et al., 2004). Cannon et al. (2002) studierten das Genom des Lanzettfischchen (Wirbellose) und fanden Sequenzen

einer variablen Multigenfamilie kodierend für zwei ununterbrochene Immunglobulindomänen und eine Chitin-bindende Domäne VCBP (*V region containing chitin-binding proteins*). Trotz der vielen Unterschiede der VCBPs zu Antikörpern und T-Zellrezeptoren könnten sie der Anfang der Evolution eines adaptiven Immunsystems sein, da auch VCBPs Signalpeptide zur Sekretion aufweisen, eine Chitin-bindende Domäne zur potentiellen Bindung an Parasiten und Immunglobulindomänen zur möglichen Auslösung einer Immunantwort (Litman et al., 1999). Vieles bleibt dennoch unklar und die Suche nach dem Ursprung des adaptiven Immunsystems geht weiter.

Bei der Bildung von Antikörpern, die eine spezielle Errungenschaft des adaptiven Immunsystems bei Kiefernäulern (Gnathostomata) darstellen, sind die B-Lymphozyten entscheidend. Im Folgenden wird näher auf die immunologischen Prinzipien des Menschen und der Maus eingegangen.

3.1.1 Reifung der B-Lymphozyten

Antikörper werden in immunologischen Zellen – den B-Lymphozyten gebildet. Jeder B-Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche einen Membran-gebundenen Antikörper, bestehend aus einer leichten und schweren Kette, die für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind. Werden die Zellen aktiviert, sezernieren sie den Antikörper.

Die B-Lymphozyten gehen aus einer allgemeinen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark hervor, wo sie auch zu naiven Lymphozyten reifen. Im Knochenmark finden im Zellkern auf den Chromosomen 12 (schwere Kette der Maus), 6 (κ leichte Kette der Maus) und 16 (λ leichte Kette der Maus) Genumordnungen statt, wodurch die vererbten Gensegmente V (*variable*), D (*divers*) und J (*joining*) zu funktionellen Genen zusammengesetzt werden (Abb.3.1., Genumordnungen). Die variable Region der schweren Kette wird als erste gebildet. Sie setzt sich aus einem großen Pool von VH- (Maus: ~170 Gene, Riblet, 2004), D- (Maus: ~13 Gene, Riblet, 2004) und JH- (Maus: 4 Gene, Riblet, 2004) Gensegmenten zusammen. Die variable Region der leichten Kette hingegen wird nur aus den V- (Maus, κ : ~93 Gene, Martinez et al., 2001, λ : 3 Gene, Lefranc et al., 2004) und J- (Maus, κ : 5 Gene, Martinez et al., 2001, λ : 3 Gene, Lefranc et al., 2004) Gensegmenten gebildet. Die Rekombination wird über flankierende DNA-Sequenzen gesteuert und unter anderem von den speziellen Enzymen RAG-1 und RAG-2 katalysiert. Die terminale

Desoxynukleotidyltransferase (TdT) ist vor allem während der Umlagerung der schweren variablen Region aktiv und baut zusätzlich Nukleotide (N-Nukleotide, nichtmatrizenkodiert) an den Verbindungsstellen der Gensegmente zufällig ein und erhöht damit die Diversität dieser Bereiche. Ist die somatische Rekombination abgeschlossen, werden auf der Oberfläche der Zellen membrangebundene monospezifische Antikörper exponiert. Dieses Prinzip der Präsentation von Antikörpern auf der Zelloberfläche ermöglicht eine direkte Verknüpfung des Phänotyps des Antikörpers mit seinem Genotypen. Solche Genumordnungen ermöglichen aus einer kleinen Zahl von Gensegmenten eine große Vielfalt zu erzeugen. Kombiniert man dazu die verschiedenen leichten und schweren Ketten untereinander, ist eine theoretische Variabilität von ca. 10^6 möglich. Jedoch sind nicht alle Ketten untereinander kombinierbar und einige Gensegmente werden häufiger verwendet als andere. Die Diversität der Fragmente wird jedoch nochmals durch den späteren Prozess der Hypermutation (Abb. 3.1., Affinitätsreifung) gesteigert. Entwickeln die Zellen eine Bindung an körpereigene Substanzen, werden sie eliminiert oder inaktiviert.

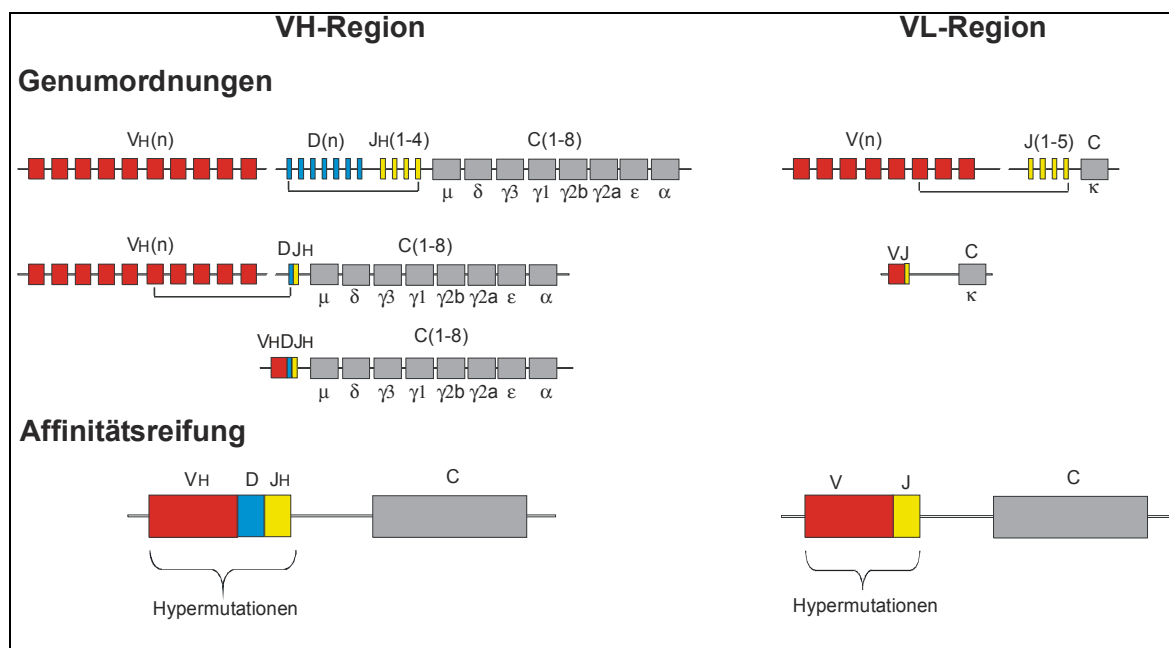


Abb.3.1. : **Schematische Darstellung der Bildung eines Antikörpers in B-Lymphozyten.** Gezeigt sind die Genumordnungen der murinen H- und L-Kettengene (am Beispiel der κ -Kette) im Knochenmark und die Hypermutationen in den variablen Regionen während der Antikörperaffinitätsreifung in den Keimzentren.

Nach der Reifung gelangen die B-Lymphozyten über das Blut in die Lymphe und somit in die so genannten peripheren lymphatischen Organe, zu denen die Lymphknoten, die Milz und das lymphatische Gewebe der Schleimhäute zählen, und treffen dort auf Antigene, die ebenfalls zu diesen Orten transportiert und festgehalten werden. So z. B. bekommen in den Keimzentren von Follikeln der Lymphknoten die B-Lymphozyten Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen und zur T-Lymphozyten, die sie zu Proliferation stimulieren. Bindet ein Oberflächenrezeptor eines B-Lymphozyten an ein Antigen, erzeugt diese Zelle identische Nachkommen mit der gleichen Spezifität (klonale Selektion). Die Bindung eines Antigens an einen B-Zellrezeptor hat für die Zelle die folgenden zwei Konsequenzen: Die Signaltransduktion, die zur Aktivierung der B-Zelle führt, und die Endozytose des Antigen-B-Zellrezeptor-Komplexes, die zur Fragmentierung des Antigens und zur Peptidpräsentation auf den MHCs führt. Bei einer thymusabhängigen Stimulation binden zusätzlich T-Zellrezeptoren spezifisch an Peptid-MHCII-Komplexe der B-Lymphozyten, die wiederum spezifisch an ein Antigen gebunden und dieses über Endozytose aufgenommen haben. Die Stimulation der B-Lymphozyten löst in den Genen der variablen Regionen den für die Affinitätsreifung der Antikörper entscheidenden Prozess der somatischen Hypermutation aus. Verbunden mit der Hypermutation werden Zellen mit hochaffinen Rezeptoren selektiert. Pro Zellteilung mutiert in den betroffenen Regionen ein Basenpaar pro 1000 Basenpaare. Bezogen auf die Länge der variablen Regionen kann in jeder zweiten Zelle während der Zellteilung eine Aminosäure im Molekül mutiert werden. Diese Mutationen häufen sich insbesondere in so genannten *hot spot*-Regionen auf der DNA. Die DNA-Polymerasen erkennen die Motive WA (A/T, A), TW (T, A/T) und RGYW (A/G, G, C/T, A/T) als *hot spots* (Rogozin et al., 2001). Das Enzym AID (*activation-induced deaminase*) löst den Prozess durch die Deaminierung der Base Cytosin zu Uracil aus (Noia und Neuberger, 2002). Diese Deaminierung kann zu einer Transition während der Replikation führen oder zu einem Austausch der modifizierten Base durch die UDG (*uracil DNA glycosylase*) mit anschließender Reparatur der DNA. Die Affinitätsreifung von Antikörpern wird vor allem in T-Lymphozyten abhängigen Immunantworten beobachtet. In dieser molekularen Evolution werden Antikörpermutanten mit einer hohen Rate als Konsequenz auf den Antigenkontakt generiert und hochaffine Mutanten selektiert. Führen die Mutationen zu einer schlechteren Bindung an das Antigen, das von follikulären dendritischen Zellen präsentiert wird, sterben die Zellen. Es herrscht eine ständige Konkurrenz zwischen Antikörpern mit geringerer und höherer Affinität um die Bindung und Aufnahme der Antigene. Nur solche B-Lymphozyten können der Apoptose entgehen, die ein Antigen endocytisiert haben und Peptide auf den MHCII-Rezeptoren für eine Stimulation durch T-

Lymphozyten präsentieren konnten. Die Beteiligung der T-Lymphozyten an der Selektion stellt zudem sicher, dass B-Lymphozyten mit Bindung an körpereigene Antigene nicht selektiert werden. Stille Mutationen unterliegen ebenfalls einer positiven Selektion. Die T-Lymphozyten vermitteln auch den Klassenwechsel durch DNA-Umlagerungen, wodurch Antikörper mit verschiedenen Effektorfunktionen gebildet werden können. Die selektierten B-Lymphocyten differenzieren weiter zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen. Die thymusunabhängige Reifung bewirkt weder einen Isotypenwechsel noch eine Gedächtniszellausbildung, sie kann aber eine Rolle bei der Reifung von B-Lymphozyten gegen Nichtproteinantigene spielen. Sind die Zellen zu Effektorzellen ausdifferenziert, verlassen sie die Lymphknoten.

3.2 Antikörper

Antikörper sind wichtige Bestandteile der humoralen Immunantwort. Sie besitzen die Fähigkeit, mit nahezu jedem Antigen hochaffine und spezifische Bindungen einzugehen. Ihre Erforschung begann 1890 durch Behring und Kitasato, die im Blutserum einer geimpften Person Antikörper entdeckten. In B-Zellen gebildet, werden Antikörper bei einer Infektion des Organismus in großen Mengen sezerniert und leisten einen bedeutenden Beitrag zur Bekämpfung eines Pathogens. Im Jahre 1975 gelang es Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) murine monoklonale Antikörper bekannter Spezifität mit der von ihnen etablierten Hybridomtechnologie unbegrenzt zu produzieren. Sie fusionierten einen spezifischen Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten mit einer speziellen Myelomzelle und schufen damit eine hybride unsterbliche Myelomzelllinie. Damit waren auch Sequenzierungen von Antikörpern bestimmter Spezifität im großen Umfang möglich. Nach der ersten dreidimensionalen Struktur 1975 durch Edmundson et al. (Edmundson et al., 1975) sind zahlreiche weitere Strukturen von Antikörpern, insbesondere von den Antigen-bindenden Fragmenten, geklärt worden. Detaillierte Informationen zur ererbten genetischen Kodierung der Antikörper waren über die Sequenzierung von Keimbahngenen oder cDNA-Kopien möglich. Mit dem Maus-Genomprojekt ist nun auch das gesamte Genom der Maus mit allen genetisch kodierten Bestandteilen des Immunsystems sequenziert worden (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).

Antikörpermoleküle werden mittlerweile gut verstanden. Neben ihrer Eigenschaft Antigene zu binden, werden zahlreiche Antikörper mit katalytischen Aktivitäten beschrieben. Viele dieser

katalytischen Antikörper wurden *in vitro* aus großen kombinatorischen Bibliotheken generiert. Schultz und Lerner (Schultz und Lerner, 2002) postulieren eine weitere immunologische Bedeutung von Antikörpern. Diese liegt darin, mittels katalytischer Aktivität Pathogene oxidativ zu zerstören. Ihre Annahme basiert auf der Beobachtung, dass alle Antikörper eine intrinsische Fähigkeit zur Oxidation von Wasser zu Wasserstoffperoxid und anderen reaktiven Sauerstoffarten besitzen. Die Rolle nach einer biologischen Bedeutung katalytisch aktiver Antikörper bleibt zurzeit dennoch offen.

Antikörper finden in der wissenschaftlichen Forschung und Medizin eine breite Anwendung als diagnostische Sonden und Therapeutika zur spezifischen Bindung von Zielmolekülen. Insbesondere murine Antikörper werden aufgrund ihrer leichten Gewinnung weit erforscht. Diese Fülle an Informationen und Daten zur Antikörpern ermöglichen weitergehende Arbeiten zur molekularen Entstehung der Affinität und Spezifität dieser Moleküle. Mit der Erforschung der molekularen Evolution von Antikörpern, die sich in einem lebenden Organismus vollzieht, will man weiterhin auch die Evolution von hohen Affinitäten in Protein-Ligand-Interaktionen verstehen lernen und dieses Wissen dazu nutzen, in künstlichen Bibliotheken Proteine mit veränderten Bindungseigenschaften herzustellen (z. B. Antikörperdesign).

3.2.1 Struktur und Funktion

Antikörper gehören zur der großen Immunglobulinsuperfamilie, zu denen auch die T-Zell-rezeptoren, die MHCs und NKR (NKR = *natural killer cell receptor*) gehören (Barclay et al, 1997). Immunglobulindomänen findet man auch in Muskelproteinen und Kinasen innerhalb der Zelle (Harpaz und Chothia, 1994). Aber auch in wirbellosen Tieren und in einigen Bakterien sind Immunglobulindomänen gefunden worden (Teichmann und Chothia, 2000; Holmgren und Branden, 1989). Immunglobulindomänen kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor, die keine umfangreiche Diversität aufweisen (Kaufman, 2002). Die Proteine dieser Klasse kennzeichnen sich durch die Immunglobulinfaltung mindestens einer ihrer Domänen. Diese wiederum bestehen aus zwei β -Faltblättern, die über konservierte Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es wird zwischen den C- und V-Domänen in Antikörpern unterschieden. Die V-Domänen besitzen einen zusätzlichen Strang in jedem Faltblatt und spielen die wesentliche Rolle in der Antigenerkennung. Die C-Domänen dagegen lösen durch Bindung an Rezeptoren einen Effektormechanismus zur Eliminierung

eines Pathogens aus, wobei die unterschiedlichen Immunglobulinklassen, die von den C-Domänen gestellt werden, auch unterschiedliche Antworten auslösen. Proteine, die der Immunglobulinsuperfamilie angehören, sind an Erkennungsprozessen, wie der Antigenerkennung und der Zell-Zell-Interaktion beteiligt. Antikörper im Menschen und in der Maus existieren in fünf verschiedenen Klassen (IgG, IgE, IgA, IgM und IgD) und unterteilen sich nochmals in Subklassen (Maus: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3; Mensch: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2). Sie unterscheiden sich in der Struktur ihrer C-Domänen, der Verteilung im Körper und der biologischen Funktion. Antikörper übernehmen so eine Rolle von Adaptermolekülen zwischen der spezifische Erkennung eines Antigens durch den Fab-Teil und das Auslösen einer immunologischen Antwort durch Interaktionen des Fc-Teils mit Effektormolekülen (Fc-Rezeptoren und Komplementproteine) des Immunsystems. Antikörper werden von zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 3.2.A.), gebildet.

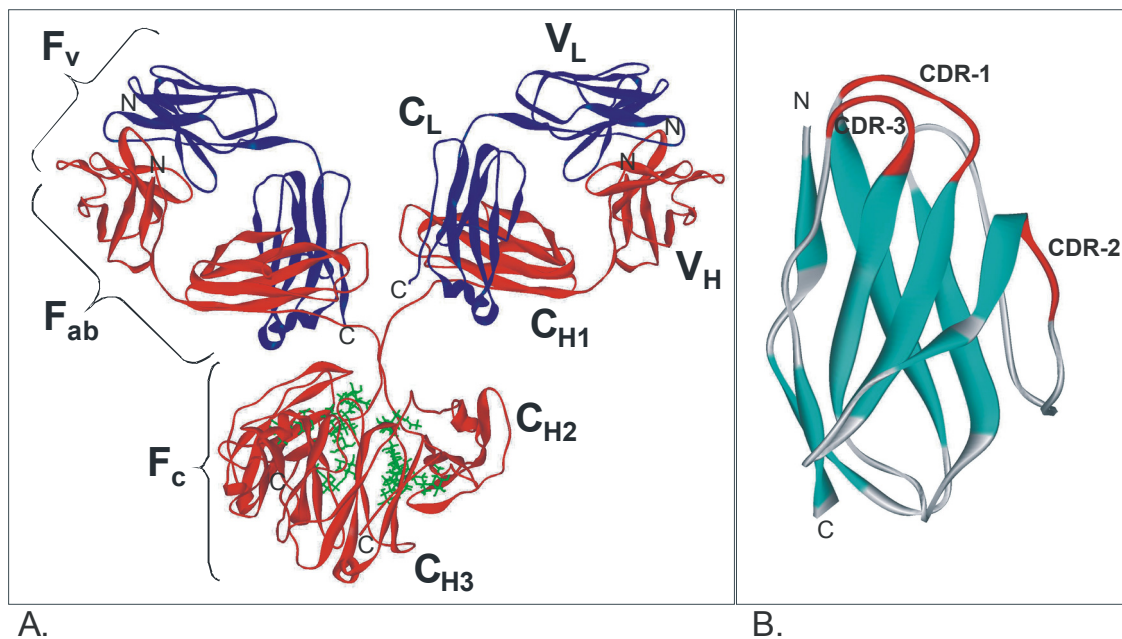


Abb. 3.2. : **Darstellung eines IgG und einer variablen Domäne.** (A.) Peptidrückgrat der leichten (blau) und schweren Kette (rot) mit den jeweiligen Domänen. Die Kohlenhydrate sind grün dargestellt. (B.) V-Domäne am Beispiel der leichten Kette mit den β-Strängen (hellblau) und den CDRs (rot) (nach Harris et al., 1998).

Die Fab-Teile setzen sich gleichermaßen aus jeweils zwei variablen (V-Domänen, F_v) und zwei konstanten Domänen (C-Domänen) der leichten und schweren Kette zusammen. Eine

Ausnahme macht die zusätzliche Klasse der Schwereketten-Antikörper, denen die leichte Kette fehlt. Diese Antikörper wurden als erste in Kameliden beschrieben (Hamers-Casterman et al., 1993). Die Fc-Teile variieren in der Anzahl der konstanten Domänen (IgM und IgE jeweils drei statt zwei) und bestehen nur aus der schweren Kette. Die posttranslationale Modifizierung der konstanten Domänen mit Kohlenhydraten spielt eine wichtige Rolle in der spezifischen Wechselwirkung der konstanten Domänen mit Rezeptoren und eine in der korrekten Antikörperfaltung (Wright und Morrison, 1997). Die Gelenkregion (*hinge*), die sich zwischen der C₁- und der C₂-Domäne befindet, kann in der Länge variieren und ist glykosylierbar. Ihre Bedeutung liegt in der Flexibilität des Fc-Teils, die entscheidend für die Bindung an den entsprechenden Fc-Rezeptor ist (Burton, 1990). Der IgE-Antikörper besitzt zusätzlich noch eine Gelenkregion zwischen der C₂- und C₃-Domäne. Die V-Domänen variieren in ihrer Sequenz, daher auch die Bezeichnung V (*variable*). Die Sequenzvariabilität verteilt sich jedoch ungleichmäßig und konzentriert sich in drei Loop-Regionen, die als hypervariable Regionen (CDRs, Abb. 3.2.B.) benannt werden und an der Antigenbindung beteiligt sind. Konservierte Aminosäuren findet man bevorzugt in den vier Gerüstregionen (FR), die auch die β -Faltblätter, bestehend aus vier bzw. fünf β -Strängen, ausbilden und die strukturelle Basis der Domäne bestimmen. Die variablen Domänen bestehen somit aus einer strukturell und sequenziell variablen Bindungsregion (hauptsächlich CDRs) und einem konservierten Gerüst (FRs).

3.2.2 Molekulare Basis der Antikörper-Antigen-Erkennung

Antikörper können in ihrer Bindungstasche Antigene unterschiedlicher Größe, Form und Ladung (Haptene, Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren) reversibel binden. Diese Komplexbildung zwischen dem Antigen und dem Antikörper lässt sich thermodynamisch und kinetisch beschreiben. Die Bindung im Komplex ist nicht-kovalenter Natur und kommt durch eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen zustande. Die stärkste dieser Wechselwirkungen ist die elektrostatische Wechselwirkung permanent geladener Gruppen. Sie verliert jedoch stark an Attraktivität in wässriger Umgebung durch die hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers. Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen (12-38 kJ/mol) liefern in der Summe der Bindungen über die gesamte Kontaktfläche hohe Affinitäten. Wesentlich für die freie Energie der Bindung sind auch die hydrophoben Wechselwirkungen, wobei ihre Stärke proportional der dem Wasser

abgewandten Oberfläche ist. Hydrophobe Kontakte können durch den Entropiegewinn des Wassers zu einem großen Anteil der freien Energie der Bindung beitragen. Effektiv sind die beschriebenen Interaktionen in einer Distanz von 1-3 Å. Die Antigen-Fab-Komplexbildung ist der vereinfachten Reaktion in der Abb. 3.3. zu entnehmen.

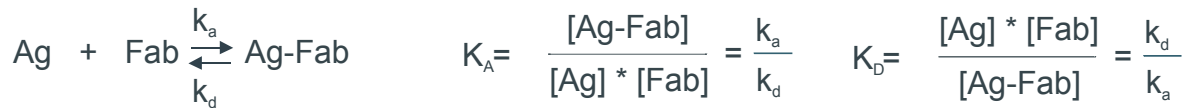


Abb.3.3. : **Komplexbildung zwischen einem Antigen (Ag) und einem Fab-Fragment eines Antikörpers nach einem Ein-Schritt-Mechanismus.** Die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergeben sich aus den kinetischen Konstanten für die Assoziation (k_a) und die Dissoziation (k_d).

Die thermodynamische Eigenschaft dieser Bindung im Gleichgewicht lässt sich über die Gleichgewichtskonstante K_A bestimmen, die eine Aussage über die Stärke (Affinität) der Assoziation zwischen zwei Molekülen macht. K_A beschreibt die Bildung des Komplexes, während der Zerfall der Komplexe von dem reziproken Wert - der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D - beschrieben wird. Die Geschwindigkeit mit der sich der Komplex ausbildet, wird mit der Geschwindigkeitskonstante k_a (Assoziation, k_{on}) und der Zerfall mit der Konstante k_d (Dissoziation, k_{off}) wiedergegeben. Gibt es keine großen Konformationsänderungen beider Bindungspartner, so kann die Assoziation sehr schnell ablaufen. Bei sehr schnellen Kinetiken wird die Diffusion der Moleküle für die Reaktion geschwindigkeitsbestimmend. Diffusions-kontrollierte Prozesse liegen dann im Bereich von $10^9 - 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für den k_a und $10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ für den k_d (Ferscht, 1999). Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von Protein-Interaktionen wird stark von der Geometrie der Interaktion und der elektrostatischen Anziehungskräfte beeinflusst und kann untere Werte von $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreichen. Sehr stabile Komplexe können langsam bis in einen Bereich von $k_d = 10 \text{ s}^{-1}$ dissoziieren, wenn starke Kräfte, die für die Bindung zuständig sind, überwunden werden müssen.

Biologisch relevante K_D -Werte befinden sich im Bereich $\leq 10^{-3} \text{ M}$, wie unter anderem am Beispiel von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen berichtet wurde (Müller-Loennies et al., 2000). Die Affinitäten von *in vivo* gebildeten Antikörpern reichen vom μM - bis in den pM -

und in einem bekannten Fall sogar bis in den sub pM-Bereich (Rathanaswami et al., 2005), obwohl Foote und Eisen (1995) *in vivo* eine Affinitätsobergrenze von 100 pM angeben. Demnach haben B-Zell-präsentierte Antikörper mit einer Affinität unterhalb dieser Grenze keinen Selektionsvorteil. Der Grund hierfür sei die Unfähigkeit der Zellen, bedingt durch den Endozytoseprozess, langsamere Dissoziationskinetiken der Oberflächenrezeptoren zu unterscheiden. Die Selektionsgrenze für k_d wird von den Autoren auf 10^{-3} - 10^{-4} s⁻¹ geschätzt. Ein maximaler k_a für die Bindung eines Antigens an einen Antikörper liegt nach Foote und Eisen (1995) bei 10^5 - 10^6 M⁻¹ s⁻¹. Eine von den Diffusionskoeffizienten der reagierenden Moleküle kontrollierte Kinetik bringt keinen Selektionsvorteil mehr. Dieses Limit wäre mit somatischen Punktmutationen nicht mehr zu überwinden.

Ein *in vitro* generierter Antikörper wurde in der Literatur mit K_D im fM-Bereich (48 fM) beschrieben (Boder et al., 2000). Dieser selektierte Antikörper demonstriert, dass Antikörper nicht für die *in vivo* Obergrenze für die Affinitätsreifung verantwortlich sind. Die freie Energie der Bindung ΔG ($= \Delta H - T\Delta S$) biologischer Reaktionen ist stark exergonisch und liegt im Bereich von -20 bis -80 kJ/mol.

Zahlreiche Methoden wie zum Beispiel der ELISA, die Isotherme Titrationskalorimetrie, die Gleichgewichtsdialyse, das Radioimmunassay (RIA), die Fällung, die Filtration, die Fluoreszenzmessungen und die SPR (*surface plasmon resonance*, Oberflächenplasmonresonanz) wurden entwickelt, um Bindungsgleichgewichte und Kinetiken der Antigen-Antikörperkomplexe zu studieren. Mit der Methode von Friguet et al. ist es möglich, mit einem kompetitiven ELISA Gleichgewichtskonstanten der Bindung in Lösung zu messen (Friguet et al., 1985). Diese Methode erfordert keine Markierung des Antikörpers oder des Antigens, womit sichergestellt wird, dass die gemessenen Konstanten charakteristisch für den nativen Antikörper bzw. das native Antigen sind. Messungen nach der SPR-Methode (Jonsson et al., 1991) erlauben zusätzliche Aussagen über die Kinetiken der Komplexbildung an immobilisierten Liganden.

Bei nicht-kovalenten Bindungen ist die freie Energie einer Bindung abhängig von der Komplementarität der wechselwirkenden Oberflächen, die zur Verstärkung attraktiver und zur Minimierung abstoßender Wechselwirkungen führen. Die Spezifität eines Antikörpers definiert sich aus der Diskriminierung zwischen vielen Substanzen im Bezug auf die Bindung in der Bindungsregion und drückt aus, dass die Reaktion mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen am stärksten ist. Die höhere Affinität zu spezifischen Liganden resultiert demzufolge in stärkeren Interaktionskräften zwischen der Bindungsregion des Antikörpers

und der des Antigens. Insbesondere die elektrostatischen Wechselwirkungen können eine große Rolle für die Bindungsspezifität spielen. Durch die Minimierung der Wasser-exponierten apolaren Moleküloberfläche wird die freie Energie der Bindung dadurch negativer, dass z.B. bei der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes an der Moleküloberfläche lokalisierte Wassermoleküle freigesetzt werden, wodurch die Entropie des Wassers steigt. Die Diskriminierung großer Antigene oder ihrer Reste gegenüber kleinen ist einfach zu erklären. Antigenbindungstaschen können zu klein sein, um größere Antigene (Reste) zu binden. Für kleinere Antigene oder Antigenreste treten dagegen keine sterischen Hinderungen auf. Es kann aber zum Verlust der freien Bindungsenergie führen, wenn z. B. in einem Antigenrest, der in einer hydrophoben Seitenrestbindungstasche des Antikörpers gebunden wird, eine Methylgruppe durch einen Austausch des Seitenrestes wegfällt, wie z. B. bei der Umwandlung von Alanin in Glycin. Antigene mit einem Alaninrest werden somit spezifischer gebunden als solche mit einem Glycin an derselben Position. Das heißt also, eine maßgeschneiderte Bindungstasche kann die Abwesenheit von Gruppen erkennen. Selbst bei gleich großen Aminosäureresten, wie z.B. bei Threonin und Valin, kann zwischen der polaren Hydroxy- und der apolaren Methylgruppe unterschieden werden. Die Komplementarität zweier Oberflächen kann durch den Austausch von kontaktierenden AS-Resten oder nicht-kontaktierenden Resten, die die Konformation der kontaktierenden Reste beeinflussen, erreicht werden.

Ist die Antikörperbindungstasche und/oder das Antigen flexibel, können Abstände der Kontaktoberfläche angepasst werden. Hieraus resultiert auch die Hypothese des *induced fit* für Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Der *induced fit*-Mechanismus (induzierte Anpassung) beschreibt den Prozess der dynamischen Erkennung des Antigens. Die Antikörperbindungstasche ist erst nach der Bindung des Antigens dazu komplementär. Dahingegen wird nach dem *lock and key*-Mechanismus (Schloss-Schlüssel) das Antigen nur dann gebunden, wenn es zur Bindungstasche des Antikörpers komplementär ist (Abb. 3.4.). Eine Kreuzreaktivität bezeichnet die Bindung verschiedener Substanzen in derselben Bindungstasche, wenn diese Substanzen ähnliche Kontaktflächen haben. Dieses Bindungsverhalten von Antikörpern wird als Strukturselektivität bezeichnet. Die strukturellen Änderungen in der Struktur der Bindungsstelle können sich stark auf die Affinität auswirken. So kann eine reduzierte Flexibilität des Antigens und der Bindungsregion des Antikörpers die freie Bindungsenergie aufgrund eines günstigeren Beitrages der Entropie positiv beeinflussen und somit zu einer erhöhten Affinität beitragen.

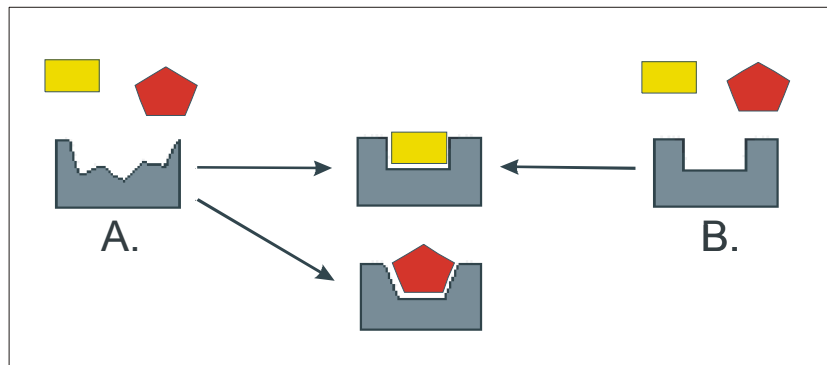


Abb.3.4. : **Schematische Darstellung des (A.) *induced fit*- und des (B.) *lock and key*-Bindungsmechanismus.** Die Antikörperbindungstaschen sind in grau und die Antigene farbig gezeichnet.

Die höchsten Bindungskonstanten (pM-Bereich) wurden vor allem bei Antikörpern gegen kleine starre Moleküle gefunden, während Antikörper gegen Moleküle mit einer Vielzahl von Freiheitsgraden (z.B. Peptide) eher Bindungskonstanten im μM -Bereich aufweisen. Merkmale, die eine Kreuzreaktivität ermöglichen, können eine lückenhafte Komplementarität der interagierenden Oberflächen und eingeschränkte Seitenketten-Umlagerungen sein. Die Polyspezifität hingegen kommt durch die Bindung strukturell verschiedener Substanzen und damit einem unterschiedlichen Bindungsmodus zustande. Für gewöhnlich werden z.B. Haptene und kurze Peptide, in Taschen oder Gruben zwischen den variablen Domänen der schweren und leichten Kette gebunden. Ein gängiges Merkmal der Antikörper-Peptid-Wechselwirkung ist das β -Turn-Motiv des Peptides (Sundberg und Mariuzza, 2002). Große Antigene, wie z.B. Proteine, werden dagegen über ein großes Areal gebunden. Wassermoleküle können den Fit in der Antigen-Antikörper-Interaktionsfläche verbessern und als Adaptermoleküle beim Fehlen einer optimalen Komplementarität fungieren. Den Wassermolekülen kommt hiernach eine wichtige Rolle in der Antigenbindung zu.

3.2.3 Antikörperdesign

Zum Studium der Antigenbindungsfähigkeit des Antikörpers lassen sich die Antigenbindenden Fragmente als Fab, F(ab)_2 , Fv ($v = \text{variable}$), scFv ($sc = \text{single chain}$) mit flexiblen Polypeptidlinker, dsFv ($ds = \text{disulfide}$), Diabody (scFv_2) und scFv-Fusionsproteine

gentechnisch herstellen, wobei die Fragmente Fab und F(ab)₂ auch durch proteolytische Abspaltung vom kompletten Antikörper zu gewinnen sind. Die Herstellung solcher auf einzelne Funktionen reduzierter Antikörper ermöglicht eine gezielte Charakterisierung und Modifikation der jeweiligen Domänen. Zudem ist die Anwendung kleinerer Antikörperfragmente in einigen medizinischen Anwendungen aufgrund ihrer geringeren Immunogenität und höheren Mobilität (Gewebebegängigkeit) sinnvoller. Die in der Molekularbiologie gut etablierte PCR-Technik ermöglicht die Amplifikation von DNA der variablen Regionen und nachfolgende genetische Manipulationen, wie z. B. die ortsgerichtete Mutagenese.

Die gentechnisch hergestellten Antikörperfragmente können *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert werden. *In vivo* Expressionen von korrekt gefalteten und funktionellen Antikörpern oder Antikörperfragmenten sind in transgenen Pflanzen und Tieren (Hiatt et al., 1989, Pollock et al., 1999), in Hefe (Ning et al., 2003), im Bakulovirus-Expressionssystem (Cao et al., 2004), in Säugerzellkulturen (Grunberg et al., 2003) und in Bakterien wie *E. coli* (Fernandez et al., 2004) beschrieben worden. Die zellfreie Proteinsynthese *in vitro* (Jiang et al., 2002) ist eine alternative Methode zur Antikörperproduktion, jedoch zurzeit nur im Labormaßstab möglich. Die Expression kleiner Antikörperfragmente (z.B. scFv oder Fab) in *E. coli* bietet die Möglichkeit der schnellen und billigeren Produktion bedingt durch das schnelle Wachstum und die einfache Kultivierung der Zellen. *E. coli* läßt sich einfach mit gentechnisch veränderten Konstrukten (Plasmidvektoren) transformieren. Die Expression in *E. coli* wird durch die N-terminale Fusion von Antikörperfragmenten mit Signalpeptiden erreicht, die das Protein ins Pеприplasma, wo Chaperone die Faltung und die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützen, delegieren. Auch korrekt im Cytoplasma gefaltete Fabs (Levy et al., 2001) oder über den α -Hemolysin Weg sekretierte (Fernandez et al., 2000) wurden beschrieben. Jedoch können nicht alle Antikörperfragmente in *E. coli* exprimiert werden. Gründe hierfür sind Faltungsprobleme, Cytotoxizität, proteolytischer Abbau, Aggregation oder die Notwendigkeit der Glykosylierung.

Künstliche Antikörperbibliotheken eröffnen die Möglichkeit, Antikörper mit gewünschten Eigenschaften aus einem großen Repertoire zu selektieren. Künstliche Antikörperbibliotheken können das Immunsystem, z.B. in der Generation, von Antikörpern gegen Autoantigene, physiologisch instabile oder toxische Haptene oder gegen Übergangszustandsanaloga für die Selektion neuer Katalysatoren übertreffen. Die Phagen-Display-Technik (McCafferty et al., 1990), das Bakterien-Display (Samuelson et al., 2002), das Hefe-Display (Feldhaus et al., 2003), die APEX-Technologie (*anchored periplasmic expression*, Harvey et al., 2004), die

eine Verankerung von Proteinen an die periplasmatische Seite der inneren Membran von *E. coli* erlaubt, die *in vitro* Display-Technologien, wie das Ribosomen-Display (Groves und Osbourn, 2005), und das m-RNA-Display (Hanes et al., 2000) mit einer Diversität von bis zu 10^{14} Molekülen und einige weitere neue Antikörper-Display-Technologien wurden hierfür etabliert. Die strukturelle Diversität von Antigenen ist weitaus höher als die Diversität dieser Bibliotheken. Normalerweise erfolgt in den *in vitro* Selektionsmethoden keine begleitende Affinitätsreifung der Antikörper wie in den B-Lymphozyten, die zur einer höheren Variabilität führt. Das Ribosomen-Display ahmt die natürliche *in vivo* Affinitätsreifung von allen anderen *in vitro* Methoden am besten nach. Beim Ribosomen-Display werden Punktmutationen, die die Affinität und Spezifität erhöhen können, während der reversen Transkription und der PCR-Amplifikation nach einer jeden Selektionsrunde eingebaut. Mit dem Verständnis der Affinitätsreifung von Antikörpern und der Identifikation von *hot spot*-Positionen könnte man mit einer limitierten Anzahl von Mutationen die zum Erfolg führende Diversität einer Bibliothek erhöhen. Das Ziel der *in vitro* Evolutionsmethoden ist es, mit den *in vivo* Reifungsmechanismen bezüglich Affinität und Spezifität der Antikörper konkurrieren zu können.

3.3 Der anti-c-myc-Peptid-Antikörper 9E10

Der monoklonale Antikörper 9E10 (IgG1/ κ) wurde aus einer Maus des Stammes Balb/c isoliert, die zuvor mit einem synthetischen Peptid immunisiert wurde, dessen Sequenz Teil einer α -Helix des humanen p62c-Myc-Protoonkoproteins (A⁴⁰⁸EEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA⁴³⁹) ist (Evan et al., 1985). Diese Region ist direkt in einer Interaktion mit dem Max-Protein involviert (Blackwood und Eisenmann, 1991). Das c-Myc-Protein spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Eine abnormale Expression des Gens dieses Transkriptionsfaktors findet man in maligne entarteten Zellen. Die Kristallstruktur in der Abbildung 3.5. zeigt die Wechselwirkung von Regionen des humanen c-Myc- und Max-Proteins mit einem DNA-Fragment (Nair et al., 2003). Daneben ist die Ausbildung eines *coiled coil* (superspiralisierte α -Helices) zwischen zwei α -Helices des Myc(393-434)-Proteins mit den Aminosäureresten 408-434 und des Max-Proteins gut zu erkennen. Daten aus einer ¹H-NMR-Struktur (Lavigne et al., 1998) belegen die Interaktion zwischen den α -Helices dieser beiden Proteine. Das humane p62c-Myc-Protein kann spezifisch mit dem 9E10-Antikörper im Elektrolot

detektiert werden. Die native Konformation als auch eine denaturierte Form des Proteins wird laut Evan et al. (1985) vom 9E10-Antikörper nicht erkannt. Diese Eigenschaft ließ sich mit der Art der Bindung des Peptides begründen, wie durch die Klärung der Komplexkristallstruktur (9E10/myc-tag-Peptid) gezeigt werden konnte (Krauß et al., 2007) und im späteren Teil der Arbeit näher erläutert wird.

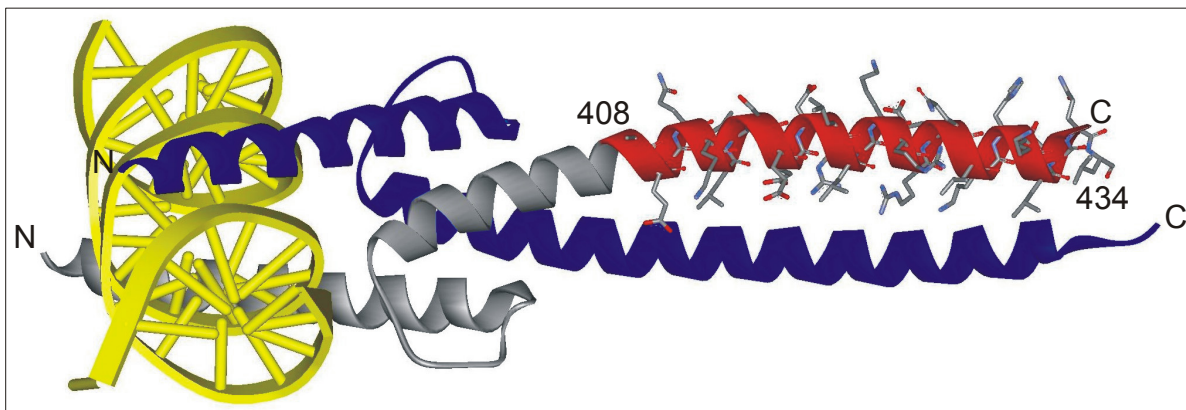


Abb.3.5. : **Darstellung des Peptidrückgrates der Proteine Myc (grau) und Max (blau), die untereinander und mit der DNA (gelb) interagieren, aus einer Kristallstruktur.** Hervorgehoben sind die α -helikalen Aminosäurereste 408-434 (rot) in einer α -Helix des Myc-Proteins, die mit der des Max-Proteins zu einem *coiled coil* assoziiert sind (nach Nair et al., 2003, 1NKP).

Das Peptid E⁴¹⁰QKLISEEDL⁴¹⁹ wurde als das Epitop des 9E10-Antikörpers beschrieben und wird als Affinitätstag zur Detektion und Reinigung rekombinanter Proteine eingesetzt (Munro und Pelham, 1986; LaVallie und McCoy, 1995). Die häufig verwendete myc-tag-Sequenz EQKLISEEDLN mit der zusätzlichen C-terminalen Aminosäure N, die das Original L ersetzt, fällt auf eine spezielle Vektorkonstruktion zurück (z. B. Hoogenboom et al., 1991). Paschke et al. (2001) entwickelten einen mit einer T_{ev}-Protease versehenen myc-tag, den MyCUT-tag mit der Sequenz EQKLISEENLYFQG, der zur proteolytischen Abspaltung rekombinanter Phagen vom gIIIp-Fusionsprotein verwendet wird. Der 9E10-Antikörper findet also eine breite Anwendung in der medizinischen Krebsforschung und der Biotechnologie zur spezifischen Detektion des humanen c-Myc-Proteins und des myc-tags. Jedoch wurde auch später eine Kreuzreaktivität des 9E10-Antikörpers mit dem murinen c-Myc-Protein von Mai, Martensson und Siegel berichtet (Mai und Martensson, 1995; Siegel et al., 1998).

Die 9E10 variablen Regionen wurden sequenziert und rekombinant als scFv bzw. in Fusion mit murinen konstanten Regionen als Fab in *E. coli* exprimiert (Fuchs et al., 1997 und Schiweck et al., 1997). Die Sequenz der V_H-Domäne zeigt eine sehr lange CDR-H3 bestehend aus 18 Aminosäuren. Auch die V_L-Domäne weist eine um 4 Aminosäuren verlängerte CDR-L1 auf. Schiweck et al. zeigten weiterhin, dass eine einzeln in *E. coli* exprimierte 9E10 V_H-Domäne mit der verlängerten CDR-H3 löslich ist, jedoch keine Bindung an das myc-tag-Peptid der Sequenz EQKLISEEDLN aufweist.

Ein K_D der Bindung von 9E10-Fab an ein myc-tag-Peptid, das N-terminal mit einem Fluorophor (Abz, 2-Aminobenzoesäure) versehen ist, wurde mit 80 ± 5 nM mittels Fluoreszenztitration bestimmt (Schiweck et al., 1997). Andererseits wird ein höherer K_D von 560 ± 190 nM zum nicht markierten myc-tag-Peptid für einen 9E10-IgG im kompetitiven ELISA von Hilpert definiert (Hilpert et al., 2001). Ein niedriger K_D von 190 ± 36 nM kommt aber bei einer Bindung zu einem modifizierten myc-tag-Peptid (EQKLISEFELN) zustande, dessen Sequenz den Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid entstammte (Hilpert et al., 2001). Das kürzeste vom 9E10-Antikörper noch gebundene Peptid ist ein 8-mer mit der Sequenz KLISEEDL und wird mit einem K_D von 26 ± 19 μ M gebunden (Hilpert et al., 2001). Eine Modifizierung des verkürzten Peptides (KLISEFEL) resultierte in einem Affinitätsgewinn (K_D $7,3 \pm 0,56$ μ M). Hilpert et al. beschreiben ebenfalls die vom 9E10-Antikörper selektiv erkannten Schlüsselpositionen LISE im Peptid, die in den Substitutionsanalysen am Peptid ermittelt wurden. Fujiwara et al. (2002) verbesserten mit dem Klon 3DX die Affinität des 9E10-scFv in einer Phagen-Display-Bibliothek. Die verbesserte Affinität resultiert hauptsächlich aus Mutationen im Linkerpeptid des scFv. In einem Screen einer 27-mer Peptidbibliothek gegen den 9E10-Antikörper mit Hilfe des mRNA-Display finden Baggio und Burgstaller et al. (2002) Peptide mit der Konsensussequenz XQ/EXLISEXXL/M, die an den 9E10-Antikörper binden, wieder.

Wenig später wurde die Kristallstruktur des 9E10-Fab im Komplex mit dem myc-tag-Peptid (Abb. 3.6.A.) und als freies Fab bei 2.7 und 2.2 Å Auflösung bestimmt (Krauß et al., 2007). Die Komplexstruktur (Abb. 3.6.B.) zeigt den N-Terminus des Peptides (E^{P410}-I^{P414}), der ein dreisträngiges β -Faltblatt mit dem aus dem Protein hervorragenden CDR-H3-Loop bildet, und den C-Terminus (S^{P415}-N^{P420}), der eine kurze α -Helix ausbildet. Die Elektronendichte für die CDR-H3 und CDR-L1 in der freien Fab-Kristallstruktur ist nicht bestimmbar, was auf eine hohe Flexibilität dieser Regionen deutet (Krauß et al., 2007). Thermodynamische Daten aus der isothermischen Titrationskalorimetrie zeigen zudem einen großen ungünstigen Beitrag der

Entropie zur freien Energie der Bindung an das myc-tag-Peptid (Krauß et al., 2007), was wahrscheinlich auf die Flexibilität der CDRs und des Peptides zurückzuführen ist. Die Bindung an das Peptid wird eher von der günstigen Enthalpie ermöglicht. Die mit der Isothermen Titrationskalorimetrie ermittelten Bindungskonstanten für das myc-tag-Peptid ($K_D = 8.7 \times 10^{-7} \text{M}$) und das verkürzte Peptid KLISEEDL ($K_D = 1.7 \times 10^{-5} \text{M}$) (Krauß et al., 2007) stimmen gut mit den von Hilpert et al. (2001) ermittelten Werten im ELISA überein.

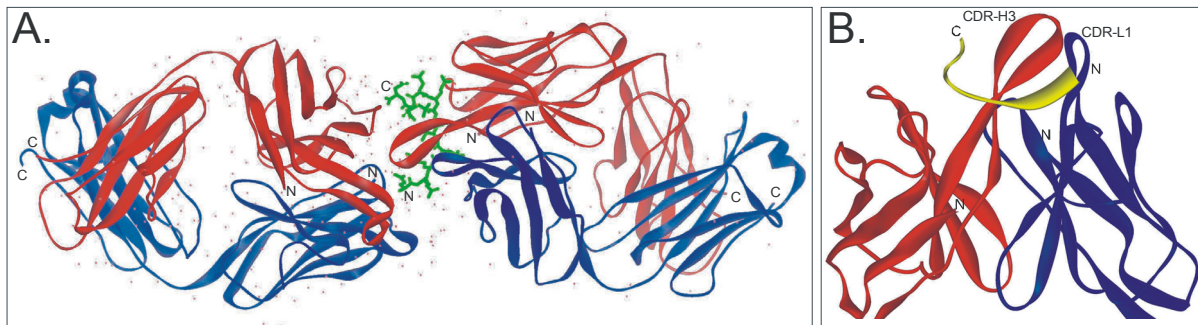


Abb. 3.6. : **Kristallstruktur zweier 9E10-Fab-Fragmente im Komplex mit dem myc-tag-Peptid (grün, A.) in einer asymmetrischen Einheit bei 2,7 Å Auflösung.** (A.) Dargestellt ist das Peptidrückgrat der schweren (rot) und leichten (blau) Kette des bindenden (rechts) und des nicht bindenden (links) Fab-Fragmentes sowie die Wassermoleküle (Punkte). (B.) Hier ist das Peptidrückgrat des myc-tag-Peptides (gelb) bei der Bindung an die variablen Domänen V_H (rot) und V_L (blau) gezeigt (nach Krauß et al., 2007).

3.4 Die Affinitätsreifung von Antikörpern

Die molekulare Evolution zahlreicher Antikörper wurde bereits in der Literatur beschrieben. Viele der Arbeiten betreffen Antikörper, die kleine und starre Moleküle, wie Haptene, binden (z.B. Yang et al., 1999, 2003, Jimenez et al., 2004, Furukawa et al., 2001, Yin et al., 2001, Sagawa et al., 2003, Wedemayer et al., 1997, 2003, Yin et al., 2003, Pauyo et al., 2006). Weniger wurde über die Affinitätsreifung von anti-Protein- (Li et al., 2003, Adams et al., 2003, Rathanaswami et al., 2005), anti-Peptid- (Manivel et al., 2000, Zahnd et al., 2004), anti-Kohlenhydrat-Antikörpern (z.B. Nguyen et al., 2003) und Schwereketten-Antikörpern berichtet (z.B. De Genst et al., 2004, 2005, Dooley und Flajnik, 2005).

Im Folgenden soll an einigen ausgewählten Beispielen die Antikörperaffinitätsreifung kurz umrissen werden.

Anti-Hapten-Antikörper wie der 4-4-20 erreichen ihre hohe Affinität und Spezifität durch eine stärkere Verankerung des Antigens und eine dichtere Packung des Komplexes (Jimenez et al., 2004). Direkte Messungen der Proteindynamik von Jimenez et al. mittels der Photonenspektroskopie an diesem anti-Fluorescein-Antikörper zeigen, dass somatische Mutationen in der V_L -Domäne die Flexibilität der Bindungstasche verringern und somit zu einer höheren Affinität des gereiften Antikörpers beitragen. Experimente zur Bindungskinetik mit der auf die Keimbahngensequenz rückmutierten V_L -Domäne assoziiert mit der gereiften V_H -Domäne ($L_{\text{Keimbahn}}/H_{4-4-20}$) führten zur einer 12-fachen Abnahme der Affinität wobei die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe um das 7-fache zunahm. Die Punktmutationen $H^{L34}R$ (CDR-L1) und $L^{L36}V$ (FR-L2) sind die einzigen Austausche während der Affinitätsreifung in der V_L -Domäne. Sie nehmen großen Einfluss auf die Versteifung des Komplexes wie aus den Daten zur Proteindynamikcharakterisierung und den Kinetik- und Thermodynamikmessungen ersichtlich wird. Der Rest R^{L34} ist, laut Kristallstrukturanalyse, an einer Wasserstoffbrücke mit dem Antigen beteiligt. Der Rest V^{L36} vermittelt eine dichtere Packung durch Interaktionen mit R^{L34} .

Die thermodynamischen Daten einer Gruppe von anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl-Antikörpern belegen, dass die Affinitätszunahme in diesem Fall auf einer Zunahme der Entropie ohne signifikante Änderungen der Enthalpie basiert (Sagawa et al., 2002). Auch hier gehen die Autoren von einem Schift von einem *induced fit*- zu einem *lock and key*-Bindungsmechanismus während der Antikörperreifung aus.

Der 28B4 mit einem k_{cat}/K_M von $1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist ein redox aktiver katalytischer Antikörper (Yin et al., 2001). Der Affinitätsanstieg des gereiften 28B4 (von $K_D = 25 \text{ }\mu\text{M}$ auf $K_D = 37 \text{ nM}$) wird durch eine schnellere Assoziation der Komplexe und zunehmende elektrostatische und hydrophobe Interaktionen mit dem Hapten verursacht. Das Hapten wird vom Affinitäts-gereiften 28B4 mehr nach einem Schloss-Schlüssel-Prinzip gebunden. Dagegen kommt es zu großen Konformationsänderungen in der CDR-H3 und CDR-L1 des Keimbahn-kodierten 28B4 bei der Bindung an das Hapten.

Bei der Bindung kleiner Antigene scheint mit der Affinitätsreifung des Antikörpers die konformative Flexibilität der Bindungsregion eingeschränkt zu werden. Demnach folgen Keimbahn-kodierte Antikörper einem *induced fit*-Bindungsmechanismus, der sich mit

Versteifung der Bindungsregion durch somatische Mutationen zum *lock and key*-Bindungsmechanismus mit hoher Bindungsspezifität wandelt.

Die zunehmende Affinität während des Reifungsprozesses kann das Resultat spezifischer Interaktionen zwischen dem Antigen und dem Antikörper (enthalpischer Effekt) oder einer Versteifung der Antikörperbindungstasche (entropischer Effekt) oder von beiden sein. Pauyo et al. (2006) haben an Antikörpern aus verschiedenen Stadien der Immunantwort gegen ein Diketonhaptan gezeigt, dass die Affinitätszunahme durch die Kombination beider Faktoren (Enthalpie und Entropie der freien Bindungsenergie) erreicht wird. Unterschiede in der Bindungsstärke dieser Antikörper waren auf Längen- und Sequenzunterschiede in der CDR-H3 zurückzuführen. Ihre Ergebnisse zeigen den Antikörper mit der höchsten Affinität als den mit der längsten CDR-H3 (19 AS-Reste) und der höchsten Anzahl positiv geladener Reste. Der Antikörper mit der kürzesten CDR-H3 (9 AS-Reste) zeigt die schwächste Affinität. Den Autoren zufolge ist der verbesserte Enthalpiefaktor mitverantwortlich für die Affinitätszunahme.

Für weitere anti-Hapten-Antikörper wurden Änderungen in der Konformation der Antikörperbindungsstelle (Wedemayer et al., 1997) und somatische Mutationen, die die optimale Bindungskonformation fixieren und mit der Bindung von Nicht-Antigenmolekülen in Konflikt stehen (Yin et al., 2003), berichtet. Keimbahn-kodierte Antikörper könnten in der Lage sein, mehr als eine Bindungskonformation anzunehmen, was ihr Bindungspotential im Vergleich zu gereiften Antikörpern erhöhen würde. Die Flexibilität der Paratope unreifer Antikörper, die allerdings zu einem ungünstigen Beitrag der Entropie zur freien Bindungsenergie führt, ist mit mehreren Arbeiten diskutiert worden. Obwohl auch bei gereiften Antikörpern Polyspezifität beobachtet wird, geht man bei unreifen Antikörpern von einer stärkeren aus, die auf eine höhere Flexibilität in der Konformation der Bindungsregion zurückgeführt wird (Manivel et al., 2000). Demirel und Lesk (2005) fanden heraus, dass zwar die Flexibilität der Bindungstasche mit der Bindung von 48G7 an p-Nitrophenylphosphonat als Ergebnis der wechselwirkenden Kräfte sowohl bei dem Keimbahn-kodierten als auch beim gereiften Antikörper abnimmt. Die Flexibilität der Bindungstasche des freien unreifen Antikörpers ist jedoch nicht stärker als die im freien gereiften Antikörper. Die Autoren nehmen weiterhin an, dass mit der Bindung des unreifen Antikörpers an das Hapten Konformationsänderungen durchlaufen werden. Während sich die Bindung des gereiften Antikörpers an das Hapten mehr nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip verhält. Die Bindungsregion des ungebundenen, gereiften 48G7-Antikörpers weist bereits eine Konformationskomplementarität zum Hapten auf. Der unreife 48G7 hingegen nimmt

die Bindungskonformation erst während der Bindung an das Hapten an, und es gibt deshalb auch keine Konformationskomplementarität in Abwesenheit des Haptens. Solche Konformationsänderungen können über die Umordnung des Peptidrückgrates und der Aminosäureseitenreste, insbesondere der CDRs, als auch über die Orientierung der beiden variablen Domänen zueinander ablaufen. Zudem zeigen Wedemayer et al. am anti-Hapten-Antikörper 48G7 einen Affinitätsanstieg um das 30000-fache während der Affinitätsreifung. Hierbei konnte unter den neun somatisch mutierten Aminosäuren ein hoher kooperativer Effekt beobachtet werden (Yang et al., 1999).

Eine erst kürzlich erschienene Arbeit (Sethi et al., 2006), die sich mit der Polyspezifität und der konformativen Flexibilität von Keimbahngen-kodierten Antikörpern auseinandersetzt, zeigt die Bindung von drei strukturell verschiedenen Peptidepitopen an nur eine gemeinsame Paratopkonformation des Keimbahn-kodierten 36-65-Fab. Die Bindung der Peptide an diese eine Paratopkonformation erfolgt jedoch in verschiedenen Modi an unterschiedlichen Orten mit nur einer gemeinsamen Bindungsposition an zwei Tyrosinresten. Das heißt, dass trotz der beobachteten multiplen Konformationen der CDRs in den Kristallstrukturen des selben freien Fab-Fragmentes hier keine konformative Diversität der CDRs bei der Bindung an die unterschiedlichen Peptide nachzuweisen war. Die Autoren nehmen an, dass die Bindung der Peptide an die gemeinsamen Tyrosinreste die beobachtete Paratopkonformation ermöglicht, wobei es jedoch nicht essentiell ist, dass jedes Antigen in einer Bindung an diese Tyrosinreste involviert ist. Der gereifte 36-65-Antikörper wurde ursprünglich aus einer Immunisierung mit p-Azophenylarsonat gewonnen.

Manivel et al. haben am Beispiel von anti-Peptid-Antikörpern (anti-PS1CT3) der primären und sekundären Antwort zeigen können, dass die hohe Affinität und parallel dazu die Spezifität der gereiften Antikörper durch Regulation der Flexibilität des Paratops zustande kommt (Manivel et al., 2000). Die pM-Affinität des *in vitro* (Ribosomen-Display) selektierten scFv H6 gegen ein kurzes Peptid entstand mehr aus der Modulierung existierender Interaktionen in den FR-Regionen als durch neue Kontakte (Zahnd et al., 2004).

Im Gegensatz dazu erhöhen Anti-Protein-Antikörper ihre Affinität vorrangig durch Verbesserung elektrostatischer und hydrophober Interaktionen wie am Beispiel des mAk928 mit einem K_D von 0,6 pM gezeigt werden konnte (Rathanaswami et al., 2005).

Die Gruppe unter Mariuzza (Li et al., 2003) untersuchte mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen vier murine Fabs gegen dasselbe diskontinuierliche Epitop auf dem Lysozym. Die Antikörper gebrauchten dieselben Keimbahngensegmente. Ferner war die VL-

JL-Verknüpfungsstelle identisch und die CDR-H3 besaßen die gleiche Länge. Die Unterschiede innerhalb der schweren Ketten lagen bei 7, 7, 11 und 21 AS-Resten, mit zwei Mutationen, die allen vier Antikörpern gemeinsam waren. Die leichten Ketten unterschieden sich in drei AS-Positionen. Alle Substitutionen waren auf somatische Hypermutationen zurückzuführen, deren Anzahl mit der Affinität der Fabs korreliert (7 nM bis 0,2 nM). Vorhergehende Substitutionsexperimente mit Alanin in den CDRs belegten die Existenz wichtiger Schlüsselpositionen für die Antigenbindung. Drei dieser so genannten *hot spot*-Positionen befanden sich in den CDRs der schweren Kette und eine in der CDR-L1. Die Schlüsselpositionen waren konserviert und bereits durch die Keimbahngene kodiert. Sie konzentrierten sich im Zentrum der Interaktionsfläche, abgeschirmt von Wassermolekülen. Der Affinitätsanstieg beim H8-HEL Antikörper ($K_D = 0,2 \text{ nM}$) gelang durch Verbesserung der Oberflächenkomplementarität zum Antigen und zunehmender hydrophober Interaktionen. Dieser Effekt kam durch den Austausch von Seitenresten in der Peripherie der Antigen-Antikörper-Interaktionsfläche, begleitet von Konformationsanpassungen der CDR-H1 und -H2, zustande. Nach Meinung der Autoren können *hot spot*-Positionen für die Bindung bereits optimiert sein. Substitutionen oder Umordnungen dieser Reste könnten viel wahrscheinlicher zum Verlust der freien Bindungsenergie führen. Periphere Regionen würden dagegen ein höheres Potential für Optimierungen aufweisen, da sie flexibler und toleranter gegenüber Mutationen seien. Die Autoren berichten weiter, dass es zu größeren Konformationsänderungen der Antigenbindungstasche bei der Bindung des weniger affinen H26-HEL ($K_D = 7 \text{ nM}$) an das Antigen kommt, was bei der Bildung der höher affinen Komplexe weniger beobachtet wurde. Ihrer Meinung nach ist die Affinitätsreifung von Antikörpern mit einer Minimierung der Mobilität von Loop-Regionen während der Komplexbildung und damit der Ausgleichung des nachteiligen Entropiebeitrages für die freie Bindungsenergie verbunden.

Mit Hilfe einer Simulation der molekularen Dynamik konnte man starre und flexible Bereiche in der Antigenbindungstasche des Hühnerei-Lysozym bindenden HH63-Antikörpers nachweisen und eine Kombination aus einem *induced fit*- und *lock and key*-Bindungsmechanismus vorschlagen (Sinha und Smith-Gill, 2005). Die flexiblen Regionen setzten sich aus geladenen und polaren Resten zusammen und formen Wechselwirkungen mit dem Hühnerei-Lysozym im Gegensatz zu den starren Bereichen. Die flexiblen Bereiche könnten laut Autoren an der molekularen Erkennung des Hühnerei-Lysozyms beteiligt sein.

Nguyen et al. (2003) haben am Beispiel des Keimbahn-kodierten S25-2 Antikörpers gegen ein bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) eine gattungsspezifische (Chlamydia) Erkennung von

mehreren Epitopen durch den Antikörper zeigen können. Der S25-2 bindet das Trisaccharidepitop mit einem niedrigen K_D von 770 nM, wobei ein Monosaccharidrest in einer in den Keimbahngen kodierten Bindungsstelle gebunden wird. Die weiteren Reste des Epitops, die sich unterscheiden können, werden von CDRs mit limitierter Flexibilität gebunden. So wird laut Nguyen et al. ein Schutz gegen verbreitete Pathogene und eine Flexibilität für die Erkennung neuer Krankheitserreger gewährleistet.

Viele der Arbeiten haben gezeigt, dass Keimbahn-kodierte Antikörper eine hohe Flexibilität ihrer Antigenbindungsstellen aufweisen können, was wiederum zu einer hohen Polyspezifität und Kreuzreaktivität führen kann. Die Selektion von Keimbahngensegmenten dieser Eigenschaft scheint eine Antwort des Immunsystems darauf zu sein, mit einem begrenzten Genrepertoire auf eine Vielzahl von Antigenen zu reagieren. Die Affinitätsreifung wird durch eine Vorordnung der bindenden Konformation im Keimbahngen-kodierten Antikörper erreicht.

Die Reifung eines Schwereketten-Antikörpers beschreibt De Genst et al. (2004) am cAB-Lys3 aus einem Dromedar. Dieser anti-Lysozym-Antikörper akkumulierte fünf Mutationen in der CDR-1 und -2, wovon drei hydrophobe Reste einen Teil eines hydrophoben Kerns in der CDR-1 ausbilden. Der Wert für die kinetische Konstante k_d nimmt im Reifungsprozess stark ab und die Bindungsreaktion wird von der Enthalpie dominiert. Die Reifung wird mit der Zunahme günstiger Bindungsinteraktionen begleitet. Ausgeprägte Konformationsänderungen bei der Bindung des Keimbahngen-kodierten Antikörpers an das Antigen konnten nicht beobachtet werden. Dieser Antikörper reift scheinbar durch die Ausbildung zusätzlicher Kontakte und durch die Erhöhung der Oberflächenkomplementarität. Die Affinitätsreifung des cAb-Lys3 zeigt mehr Ähnlichkeiten mit der von Li et al. (2003) beschriebenen Affinitätsreifung des konventionellen Antikörpers anti-Lysozym HEL8 als mit den Reifungsmechanismen der konventionellen anti-Peptid- und anti-Hapten-Antikörper mit stärkeren Konformationsänderungen in der Antigenbindungstasche.

3.4.1 Die hypervariable CDR-H3

Bei der Bindung eines Antigens sind größtenteils die CDRs involviert. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Antigens können alle sechs CDRs oder nur einige an der direkten Bindung beteiligt sein. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der zentral in der

Bindungstasche gelegenen CDR-H3 zu, die sich aus den drei Gensegmenten VH, D und JH und den zufällig inserierten N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen zusammensetzt. Das D-Gensegment kodiert den größten Teil der CDR-H3. Damit ist die CDR-H3 die variabelste Region, was sowohl die Sequenz als auch die Länge und Struktur betrifft. Änderungen in der Konformation der CDR-H3 bei der Bindung an ein Antigen konnten beobachtet werden. Besonders lange CDR-H3 können bewirken, dass bis zu 100% des Kontaktes mit dem Antigen von dieser Region aus vermittelt wird, wie am Beispiel der Kristallstruktur eines Schwereketten-Antikörpers gezeigt werden konnte (Decanniere et al., 1999). Dieses Beispiel verdeutlicht auch, dass die CDR-H3 für die spezifische Antigenerkennung in Schweren-Ketten-Antikörpern entscheidend sein kann.

Antikörper mit langen CDR-H3 wurden unter anderem in Menschen, Mäusen, Rindern, Kamelen und Haien gefunden. In Mäusen schwankt die CDR-H3-Länge von 2-19 AS-Resten und hat eine durchschnittliche Länge von ca. 10-12 AS-Resten, auch bei Menschen schwankt sie (Wu et al., 1993, Johnson et al., 1998). Nach Ramsland et al. (2001) beinhalten „primitive“ Antigenbindungsstellen öfter längere CDR-H3 als im Durchschnitt. Zum Beispiel haben humane polyreaktive IgMs aromatenreiche und lange CDR-H3 (bis zu 19 AS-Resten) (Ramsland et al., 1999). IgM-Moleküle finden sich in allen Vertebraten mit einem kombinatorischen Immunsystem. Sie weisen häufig eine Kreuz- und Polyreaktivität auf, beinhalten nur wenige somatische Mutationen, verglichen z.B. mit den IgGs, und werden bei einer Immunantwort als erste gebildet. Sie können geringe Affinitäten haben ($K_D = 10^{-4} - 10^{-6}$ M). Die IgM-Klasse repräsentiert näher das Keimbahnrepertoire der Antikörper und kann als ein Beispiel für „primitive“ Antikörper angesehen werden.

Lange CDR-H3 werden oft über interne (z.B. Schmidt et al., 1983) Disulfidbrücken oder über eine Querverbindung zur CDR-H1 oder -H2, wie in Schwereketten-Antikörpern (z.B. Desmyter et al., 1996), stabilisiert. Ramsland et al. (2001) bezweifeln jedoch, dass diese Disulfidbrücken zur Stabilisierung der CDR-H3 oder zur Versteifung der Antigenbindungsregion aufgekomen sind. Die Autoren beobachteten beim murinen NC10.14-Antikörper, dass die 16 AS-Reste lange CDR-H3 eine perfekte Nachahmung der letzten β -Schleife der C-Domäne der λ leichten Kette ist (Guddat et al., 2000). Ihrer Meinung nach waren die ursprünglichen V- und C-Domänen viel ähnlicher und lange CDR-H3 ein häufiges Merkmal von Antikörper. Lange CDR-H3 weisen ungewöhnliche Sequenzmotive mit mehrfach kodierten Prolin, Glycin, Cystein und aromatischen Resten auf. Glycin ermöglicht eine hohe lokale Flexibilität des Loops und könnte eine Antigenbindung nach einem *induced fit*-Mechanismus unterstützen. An der Basis der CDR befindliche Proline

schränken dagegen die Konformationsfreiheit ein. Sie könnten der Versteifung besonders langer und herausragender CDR-H3 dienen. Proline an analogen Positionen wurden auch in der C-Domäne der humanen λ leichten Kette gefunden (Schiffer et al., 1973, Ely et al., 1989).

Die Länge der CDR-H3 kann stark variieren. Saini et al. (1999) berichten von CDR-H3 mit bis zu 60 AS-Länge mit mehrfachen Cystein-Resten bei Rindern. Diese extrem langen Regionen treten bevorzugt in bovinen IgM-Antikörpern auf. Laut Saini und Kaushik (2001) kann nicht nur das Antigen sondern auch die limitierte Mobilität der C μ 2-Domäne in den Fabs der IgM-Moleküle die Selektion sehr langer CDR-H3 in der Antigenbindungsregion erfordern. Unterstützt wird diese Behauptung dadurch, dass in den bovinen IgGs, die eine flexiblere und lange *hinge*-Region aufweisen, keine außergewöhnlich langen CDR-H3 beobachtet wurden. Diese IgMs zeichnen sich zusätzlich durch eine eingeschränkte Verwendung des VH-Gensegmentes und eine eingeschränkte V_H/V_L-Paarung aus.

Rosner et al. (2001) beschreiben beim Menschen, dass Antikörper mit kurzen CDR-H3-Regionen für die Antigenbindung bevorzugt selektiert werden. In ihren Untersuchungen weisen die Affinitäts-gereiften Antikörper kürzere CDR-H3 auf als die nicht Affinitäts-gereiften. Die kürzeren CDRs waren auf die Verwendung kürzerer JH-Gensegmente und einer stärkeren Nukleotiddeletion an den Enden der VH-, D- und JH-Gensegmente als auch auf einen geringeren Einbau von P- (palindrom) und N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen zurückzuführen. Laut Autoren können kurze CDR-H3 mehr Raum in der Antigenbindungstasche für Interaktion des Antigens mit den übrigen CDRs, die ebenfalls zur Bindungsenergie beitragen könnten, ermöglichen. Beim 9E10-Antikörper bindet das myc-tag Peptid nicht in der typischen Antigenbindungstasche zwischen den beiden variablen Domänen, sondern außerhalb (Abb. 3.7.). In dieser Bindungsvariante hat das Peptid keinen direkten Kontakt zur CDR-L1 und -L3. Für die außergewöhnliche Bindungsstelle des Peptides ist vermutlich die Wechselwirkung der CDR-H3 mit der CDR-L1 und L3 verantwortlich. Die konventionelle Antigenbindungstasche wird während der Bindung des Peptides von der langen CDR-H3 zum Teil okkupiert. Lange CDR-H3 können durch ihre Größe den Raum zwischen der V_L- und V_H-Domäne ausfüllen oder in das Lösungsmittel herausragen. Am Beispiel zweier humaner IgM-Antikörper gegen Peptide (Ramsland et al., 2000) und Makromoleküle (Fan et al., 1992) konnte eine Abhängigkeit der Konformation des Loops von der Länge herausgestellt und die verschiedene Bindungsfähigkeit der Antikörper damit teilweise erklärt werden (Ramsland et al., 2001). Beim Pot Antikörper füllt die 12-AS lange CDR-H3 den Raum zwischen den beiden variablen Domänen aus. Beim Mez Antikörper dagegen ragt die um lediglich 2-AS längere CDR-H3 aus dem Protein heraus.

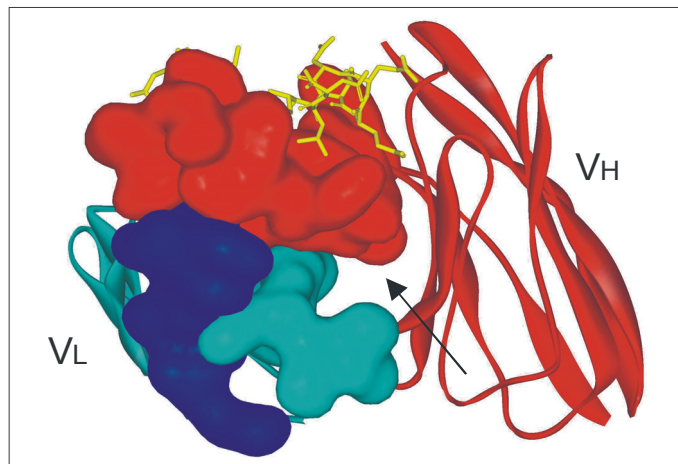


Abb. 3.7. : **Draufsicht auf die Antigenbindungsstelle des 9E10 geformt von den Domänen V_H (rot) und V_L (blau).** Das Peptid (gelb) bindet außerhalb der konventionellen Bindungsstelle zwischen den beiden Domänen (Pfeil). Die CDR-H3 (rote Oberflächendarstellung) interagiert mit der CDR-L1 (blaue Oberflächendarstellung) und CDR-L3 (hellblaue Oberflächendarstellung) (nach den Kristallstrukturdaten von N. Krauß).

Bei vielen Antikörpern konnte die Wechselwirkung der langen herausragenden CDR-H3 mit der V_L -Domäne beschrieben werden. Hier soll nur ein Beispiel erwähnt werden. Die CDR-H3 des Mez Antikörpers interagiert direkt mit der CDR-L3 (Ramsland et al., 2000). Dieser Kontakt unterstützt die herausragende Konformation der langen CDR-H3, verhindert jedoch möglicherweise den Zugang des Antigens zu den Resten der CDR-L3. Beim Schwereketten-Antikörper cAb-Lys3 fehlt die leichte Kette als unterstützende Domäne für die lange CDR-H3, jedoch wird durch die Wechselwirkung sekundärer Strukturelemente in der CDR-H3 mit den β -Strängen der V_{HH} -Domäne an der potentiellen Dimerisierungsfläche mit V_L eine Bindungsplattform gemimt (Ramsland et al., 2001).

Nach Furukawa et al. (2001) hat die Flexibilität der CDR-H3, die, ihrer Meinung nach, von den P- und N-Nukleotid kodierten Aminosäuren bestimmt wird, einen großen Einfluss auf die Konformation der Antigenbindungsstelle. Die Autoren vermuten, dass die zentral gelegene CDR-H3 den Winkel zwischen der V_H - und V_L -Domäne kontrollieren kann und somit einen Einfluss auf die Flexibilität und Größe der Bindungsstelle hat. In ihrer Arbeit mit murinen anti-NP((4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl)-Antikörpern konnten sie zeigen, dass es eine enge Beziehung zwischen der Affinitätsreifung und der CDR-H3-Struktur gibt.

Die Gruppe unter S. Muyldermans (De Genst et al., 2005) zeigt am Beispiel der Kristallstrukturen von zwei spezifischen anti-Lysozym-Schwereketten-Antikörpern aus zwei

verschiedenen Dromedaren, dass die von demselben D-Gensegment kodierten CDR-H3 trotz unterschiedlich verwendeter V- und J-Gensegmente und Aminosäuren an den Rekombinationsschnittstellen eine identische Struktur aufweisen. Beide Antikörper sind außerdem durch eine auffällig konvergente Affinitätsreifung in der CDR-H2 gekennzeichnet. Weitere Untersuchungen mit Antikörpern, zusammengesetzt aus verschiedenen D-Gensegmenten, haben eine limitierte strukturelle Vielfalt dieses Loops ergeben. Demnach wäre die Struktur der CDR-H3 in Schwereketten-Antikörpern weniger divers als durch die hohe Sequenzvariabilität vorhergesagt wird. Den Autoren zu Folge kann die Hypermutation die limitierte strukturelle Vielfalt der CDR-H3 kompensieren. Die begrenzte Strukturvariabilität der CDR-H3 der Schwereketten-Antikörper könnte diesbezüglich eine Ausnahme sein. Aufgrund der fehlenden V_L -Domäne geht Diversität verloren. In konventionellen Antikörpern kann die Interaktion der V_L -Domäne mit der CDR-H3 jedoch mehr Konformationen für diesen Loop ermöglichen.

Mit Ausnahme der CDR-H3 lassen sich die übrigen CDRs aufgrund ihrer Sequenz in kanonische Strukturen klassifizieren (Al-Lazikani et al., 1997, Decanniere et al., 2000). Die hohe konformative Variabilität der CDR-H3 lässt jedoch eine solche Charakterisierung nur im geringeren Maße zu. Shirai et al. (1999) schlagen Regeln (H3-Regeln) für die Identifizierung der tertiären Struktur der CDR-H3 aus der Sequenz vor. Morea et al. (1998) unterteilen die CDR-H3 in eine Basis- und eine Kopf-Region, wobei die Basis eine geknickte oder eine gedehnte Struktur mit einer regulären Wasserstoffbrückenausbildung einer β -Faltblattschleife annehmen kann. Den Übergang zwischen den beiden Strukturen kann eine Salzbrücke zwischen dem Aspartat 101 und einem basischen Rest an benachbarten Positionen in der CDR-H3-Basis oder der V_L -Domäne bestimmen. Morea et al. fanden weiter heraus, dass die Kopfregionen längerer CDR-H3 (bis zu 22 AS) mit einem β -*bulge* (Ausbauchung) in der Basis-Region eine Vielzahl von verschiedenen Konformationen aufweisen. In kurzen CDR-H3 oder in solchen mit gedehnten Basisstrukturen (ohne Knick) folgen die Kopf-Regionen den Strukturen von kurzen Schleifen. Laut Morea et al. ist die Konformation der CDR-H3 (konservierte Reste Cys 92-Gly 104, Nummerierung nach Kabat) stark von der Umgebung (CDR-H3, V_H - und V_L -Domäne, Antigen) abhängig. Die Basis-Region (ersten vier N-terminalen Reste und letzten sechs C-terminalen Reste) konnte dagegen in fast allen Fällen aus der Sequenz vorhergesagt werden. Die CDR-H3-Konformation des 9E10-Antikörpers im Komplex mit dem myc-tag-Peptid unterscheidet sich sehr von der freien Form in der Kristallstruktur der dimerisierten Fab-Fragmente. Die deutlichsten Unterschiede betreffen die

Kopf-Region (Abb. 3.8.(1.)). Die Basis-Region der 9E10-CDR-H3 ändert ihre Konformation bei der Bindung nicht oder nur sehr geringfügig (Arg 95).

Lange CDR-H3 sind für die Bindung von linearen Epitopen geeignet, wie am Beispiel der Bindung des HIV V3-Loops an den 447-Antikörper gezeigt werden konnte. Der CDR-H3-Loop des 447 formt ein β -Faltblatt mit dem V3-Peptid. Die Wechselwirkungen mit der CDR-H3 werden hier von Wechselwirkungen des Peptidrückgrats beider Moleküle dominiert (Stanfield et al., 2004). Die Ausbildung eines β -Faltblattes zwischen der CDR-H3 und dem Antigen konnte bei der Interaktion des 9E10-Antikörpers mit dem myc-tag-Peptid ebenfalls beobachtet werden (Abb. 3.8.(2.)).

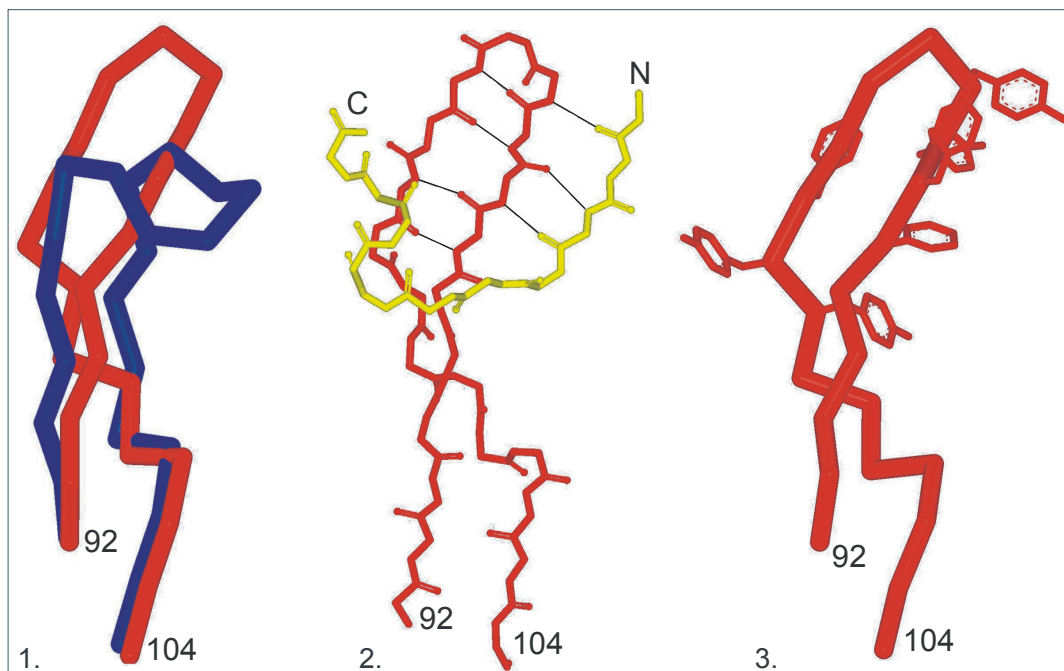


Abb.3.8. : **Kristallstrukturen der 9E10-CDR-H3 (Reste 92-104, Nummerierung nach Kabat) in den Kopf-an-Kopf dimerisierten Fab-Fragmenten.** In 1. ist die C α -Atomüberlagerung der bindenden (rot) und der nicht bindenden Konformation (blau) und in 2. die Ausbildung eines dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattes zwischen der CDR-H3 (rot) und dem N-Terminus des myc-tag-Peptides (gelb) zu sehen. (2.) Darstellung der bindenden Konformation mit den zahlreichen aromatischen Resten in der Kopf-Region (nach den Kristallstrukturdaten des 9E10-Fab von N. Krauß).

Die 9E10-CDR-H3 ist reich an aromatischen Resten. Eine dichte Abfolge von einem Phenylalaninrest und sechs Tyrosinresten kennzeichnet diesen Loop und verleiht ihm einen hydrophoben Charakter (Abb. 3.8.(3.)). Vielfach auftretende aromatische Reste in CDR-H3

können die multifunktionelle Rolle dieser Region unterstützen. Berichte von Ofek und Cardoso zeigen an Modellbeispielen mit den Antikörpern 2F5 und 4E10, dass aromatenreiche CDR-H3 die Interaktionen mit Membran-gebundenen Epitopen durch die hydrophoben Wechselwirkungen der CDR mit den Membranlipiden ermöglichen (Ofek et al., 2004, Cardoso et al., 2005). Am CD4i-Antikörper konnte man sogar eine posttranslationale Modifikation der Tyrosinreste mit Sulfatgruppen, die der CDR einen negativ geladenen Charakter für die Wechselwirkung mit basischen Rezeptorbindungsstellen verliehen, beobachten (Choe et al., 2003). Dieses Beispiel zeigt auch zum ersten Mal eine chemische Modifikation eines Antikörpers, die mit seiner Spezifität einhergeht.

Diese Beispiele verdeutlichen die gängigen Strategien der Antikörperaffinitätsreifung (wenn auch größtenteils am Beispiel von anti-Hapten-Antikörpern aufgeklärt), die nach Yin et al. (2001) wie folgt zusammengefasst werden.

- 1.) Die intrinsische Antigenpolyspezifität von Keimbahnen-kodierten Antikörpern erhöht das Bindungspotential des Antikörperkeimbahnrepertoires, wobei die CDR-H3 eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Spezifität einnimmt.
- 2.) Die Bindung von Haptenen an Keimbahnen-kodierte Antikörper induziert CDR-Konformationsänderungen, die zu einer erhöhten Komplementarität zwischen dem Antigen und dem Antikörper führen. Die Konformationsvariabilität von Keimbahnen-kodierten Antikörpern erhöht die Diversität des primären Antikörperrepertoires.
- 3.) Mutationen im Keimbahnen-kodierten Antikörper, die entweder durch die VDJ-Verknüpfungsstellen oder durch die somatische Hypermutation entstehen, minimieren die Flexibilität der CDRs und gestalten auf diese Weise die Haptenbindungstasche um. Dem Gegenüber steht jedoch die Beobachtung am 48G7-Antikörper, wonach für die CDRs des ungereiften Antikörpers im Vergleich zu denen des gereiften keine erhöhte Flexibilität beobachtet werden konnte. Mutationen können auch signifikante Änderungen in der Bindungsgeometrie des Haptens für eine optimale Haptenkomplementarität verursachen. Viele schwache Bindungsmodi existieren in den Keimbahnantikörpern, die während der Affinitätsreifung verstärkt

werden.

- 4.) Somatische Mutationen können außerhalb der Haptenbindungsstelle auftreten und die Haptenbindung indirekt modulieren. Mutationen können aber auch in der Bindungstasche auftreten und direkt mit dem Hapten interagieren.
- 5.) Der schrittweise Erwerb von funktionellen Mutationen in den Keimbahngenen ist mit einer schrittweisen Zunahme der Bindungsstärke verbunden und ist ein allgemein beobachtetes Motiv in der *in vivo* Antikörperrevolution.

Die Affinitätsreifung eines Antikörpers (Li et al., 2003) und eines Schwereketten-Antikörpers (De Genst et al., 2004) gegen das Hühnereiweiß-Lysozym (HEL) folgt dagegen mehr der Strategie der zunehmenden Oberflächenkomplementarität der Interaktionsflächen und dem Hinzufügen zusätzlicher günstiger Kontakte ohne größere Konformationsänderungen in der Antigenbindungstasche. Allerdings sollte an dieser Stelle bemerkt werden, dass die von Li et al. (2003) charakterisierten Antikörper gegen HEL bereits beträchtlich gereifte Antikörper präsentierten und keine Keimbahngenen-kodierten Antikörper in der frühen Phasen der Affinitätsreifung darstellen.

3.5 Peptidspot-Analysen

Spot-Synthesen sind eine Technik zur Herstellung von Peptiden an definierten Positionen (Spots), die eine simultane, parallele, chemische Synthese von Peptiden auf Membranen erlaubt (Frank et al., 1991; Frank, 1992; Frank und Overwin, 1996; Kramer und Schneider-Mergener, 1998). Für gewöhnlich werden die Peptide über einen Linker (z. B. β -Alanin) vom C-Terminus beginnend synthetisiert. Die Peptide lassen sich aber auch zyklisieren (Kramer et al., 1994; Winkler et al., 1998) oder umgekehrt mit einem freien C-Terminus (Schultz et al., 1998; Hoffmüller et al., 1999) herstellen. Die Peptidspot-Synthesetechnik findet eine breite Anwendung zur Identifizierung linearer und diskontinuierlicher Antikörperepitope (z.B. Adler et al., 1994) und Rezeptor-Ligand-Interaktionsflächen (z.B. Reinecke et al., 1995). Große Peptidbibliotheken (8000 Peptide / 20 x 30cm Membran, Kramer et al., 1999) zur Identifizierung von Peptiden, die an Proteine (z.B. Adam-Klages et al., 1996), Metalle (z.B. Schneider-Mergener et al., 1996) und Nukleinsäuren (z.B. Reuter et al., 1999) binden, sind

möglich. Aber auch Analysen zur Substratspezifität (z.B. Tegge et al., 1995), um nur einige Anwendungsmöglichkeiten zu nennen, sind gängig. Ein Vorteil von Peptidspots ist, dass Bindungsexperimente direkt auf der Membran gemacht werden können. Auf diese Weise lassen sich Bindungen an eine große Anzahl von Peptiden verschiedener Länge und Sequenz gleichzeitig analysieren. Die Kreuzreaktivität und Polyspezifität von Antikörpern lässt sich hiermit untersuchen. Um in linearen Epitopen Schlüsselpositionen für eine Bindung identifizieren zu können, ist es möglich, Substitutionsanalysen an den Peptiden durchzuführen (Abb. 3.9.).

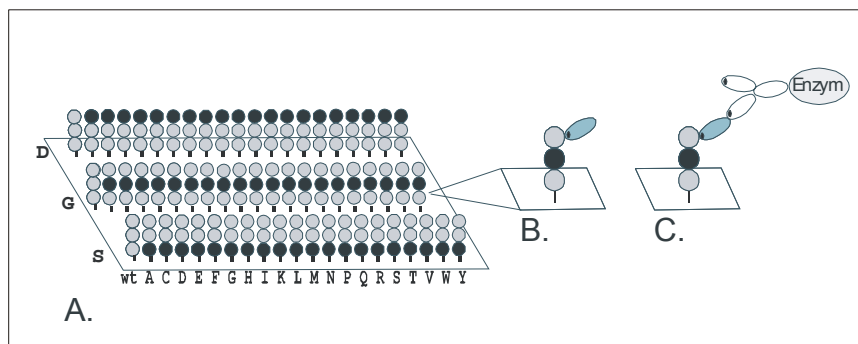


Abb.3.9. : **Schematische Darstellung einer Substitutionsanalyse zur Identifizierung von Schlüsselpositionen.** (A.) Die linke Reihe repräsentiert die Wildtypsequenz des Peptides. An diesem Beispiel wird die Bindung eines Fab-Fragmentes an ein Peptid (B.) über einen Enzym markierten sekundären Antikörper (C.) nachgewiesen (Zwei-Schritt-Detektion)

Schlüsselpositionen repräsentieren Reste, die nur durch sich selbst oder durch physikochemisch ähnliche Reste austauschbar sind, ohne dass es zu einem Verlust der Bindung käme. In den Substitutionsanalysen an einem Peptid wird jede Position, jedoch nur einmal, durch alle zwanzig proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. Auf der Membran entsteht so eine Bibliothek aus punktsubstituierten Peptiden.

Die Abbildung 3.10. zeigt eine Substitutionsanalyse am myc-tag-Peptid und einer verkürzten Variante (KLISEEDL) des Peptides und den daraus von Hilpert et al. abgeleiteten Schlüsselpositionen LISE (Hilpert et al., 2001). Die schwarzen Spots entsprechen einer Bindung des 9E10-Antikörpers an das jeweilige Peptid. Mit Hilfe solcher Peptidspots wurde z.B. auch die polyspezifische Bindung des anti-p24(HIV-1)-Antikörpers (CB4-1) an weitere Peptide neben dem p-24-Peptid nachgewiesen (Kramer et al., 1997). Substitutionsanalysen an

den jeweiligen Peptiden, unterstützt durch Kristallstrukturanalysen, belegten unterschiedliche Bindungsarten der Peptide durch den CB4-1-Antikörper.

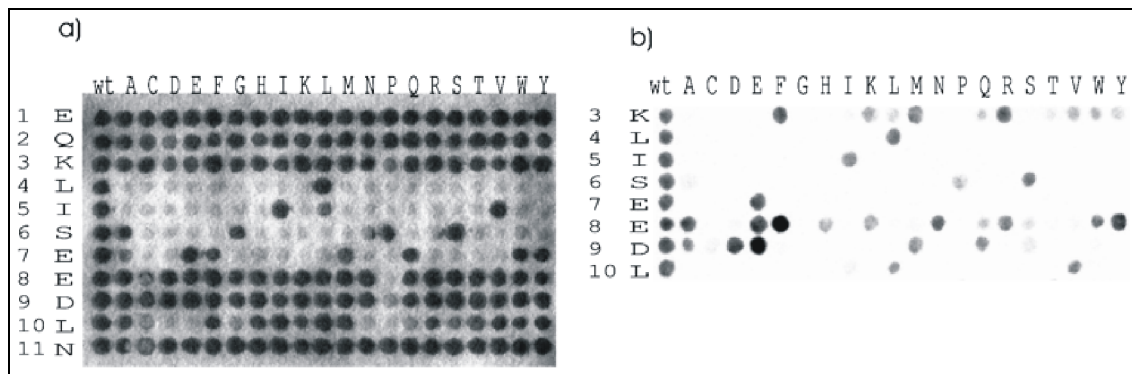


Abb. 3.10. : Substitutionsanalysen an den Peptiden myc-tag (a.) und einem verkürzten myc (KLISEEDL, (b.)). Der gebundene 9E10-Antikörper wurde über einen HRP-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert, und die Membranen wurden mit Diaminobenzidin (a.) bzw. einem Chemilumineszenzsubstrat (b.) entwickelt (Hilpert et al., 2001).

4 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war, einen Einblick in die Affinitätsreifung des anti-Peptid-Antikörpers 9E10 mit seiner außergewöhnlich langen CDR-H3, vom Keimbahn-kodierten Vorläufer zum gereiften hochaffinen Antikörper, zu gewinnen. Dies sollte durch Rückmutationen des Antikörpers auf die Sequenzen der murinen Immunglobulinkeimbahngene und durch Charakterisierung der Bindung zu c-myc-Peptiden unterschiedlicher Affinität erreicht werden.

Dazu sollten eine komplette 9E10-Rückmutante, jeweils eine komplette Rückmutante der V_H- bzw. V_L-Domäne sowie ausgewählte Einzelrückmutanten an den Positionen H^{H31}, G^{H52}, R^{H53} und H^{H58} in der V_H-Domäne, die in räumlicher Nachbarschaft zum veränderten C-Terminus der Peptide MyCUT (EQKLISEENLYFQG) und der verkürzten modifizierten myc-tag-Variante (KLISEFEL) stehen oder Bestandteil einer zum C-Terminus der Peptide benachbarten CDR sind, gentechnisch hergestellt werden. Mit solchen Rückmutationen sollte der Einfluss einzelner Reste bzw. Domänen auf die Affinität und Spezifität des 9E10-Antikörpers studiert werden.

Die Arbeit baut sich aus den folgenden Punkten mit Schwerpunkt auf der Charakterisierung der 9E10-Rückmutanten hinsichtlich Affinität und Spezifität zum myc-tag-Peptid (EQKLISEEDLN) und einer schwächer affinen verkürzten Variante (KLISEEDL) auf:

- Identifizierung der Keimbahngensegmente mit höchster Homologie zu 9E10
- Konstruktion der 9E10-Rückmutanten
- Bakterielle Fab-Expression und Reinigung der 9E10-Rückmutanten
- Charakterisierung der Bindungskonstanten der 9E10-Rückmutanten zu den myc-Peptiden
- Charakterisierung der Spezifität der 9E10-Rückmutanten in Substitutionsanalysen an den myc-Peptiden

Dieses Wissen soll dazu dienen den Bau molekularer, auf 9E10 basierender Bibliotheken zu ermöglichen aus denen höher affine Binder zum MyCUT-tag und dem verkürzten modifizierten myc-tag (KLISEFEL) selektiert werden sollen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-	
[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Serva, Heidelberg
2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Merck, Darmstadt
2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dNTP)	Boehringer Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Appligene
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Fluka, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampecillin (Amp)	Ratiopharm
Anhydrotetracyclin (aTc)	Acros Organics, USA
Bacto-Trypton	Oxoid, UK
Borsäure	Fluka, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	J.T. Backer, Holland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidin-Hydrochlorid	Applichem, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Oxoid, UK

Imidazol	Applichem, Darmstadt
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Arginin-Hydrochlorid	Applichem, Darmstadt
L-Glutathion (GSH)	Applichem, Darmstadt
L-Glutathion (GSSG)	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Laborchemie Apolda
Methanol	J.T. Backer, Holland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumformat	Fluka, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraffinöl	Laborchemie Apolda
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Universal Agarose	Peqlab, Erlangen

Alle verwendeten Chemikalien wiesen einen hohen Reinheitsgrad (*analytical grade*) auf.

5.1.2 Lösungen, Puffer und Nährmedien für Arbeiten mit *E. coli*

Glycerol	steril autoklaviert
Anhydrotetracyclin (aTc)	5 mg/ml in DMF

Puffer für Periplasmaaufschluss

Periplasmapuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 500 mM Saccharose steril filtriert
------------------	---

Puffer zur Isolierung von Einschlusskörperchen

Zelllysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA 100 µg/ml Lysozym 0,5 % (v/v) Triton X-100
Waschpuffer A.	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100 0,5 M NaCl
Waschpuffer B.	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA
Renaturierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA 0,4 M L-Argenin-Hydrochlorid 3 mM GSH 0,9 mM GSSG

Nährmedien

SOC	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt
-----	--

	8,6 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	steril autoklaviert:
	20 mM Glucose (steril filtriert)
LB (<i>Luria-Bertani</i>)	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Hefe-Extrakt
	171 mM NaCl
LB mit Agar-Agar	LB
	15 g/l Agar-Agar
LB-ls (<i>low salt</i>)	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Hefe-Extrakt
	86 mM NaCl

Alle Medien haben einen pH von 7,5 und sind steril autoklaviert.

5.1.3 Puffer und Lösungen für Proteinexperimente

10 x PBS (phosphate buffered saline)	1,5 M NaCl
	92,7 mM Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
	16,2 mM NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O
	pH 7,5
	steril autoklaviert
TTBS (tween tris buffered saline)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5
	154 mM NaCl
	0,1% (v/v) Tween 20

Peptidspotanalysen

TTBS Peptidspotpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	500 mM NaCl
	0,01 % (v/v) Tween 20

steril filtriert

ELISA

ELISA-Bindungspuffer
15 mM Na_2CO_3
35 mM NaHCO_3
eine Spatelspitze Phenolrot
pH 9,6, filtriert

ELISA-Waschpuffer
1 x PBS
0,5% (v/v) Tween 20

SPR an Biacore

HBS (HEPES buffered saline)
10 mM HEPES
150 mM NaCl
3 mM EDTA
0,005% (v/v) Surfactant P20
pH 7,4 (Biacore, Uppsala, Schweden)

Borat-Puffer
0,1 M Borsäure, pH 8,5

Natriumformat-Puffer
0,1 M Natriumformat, pH 4,3

Glycin-Puffer, pH 1,5
Biacore, Uppsala, Schweden

Proteinreinigung

Equilibrierungspuffer
50 mM Natriumphosphat, pH 8,0
300 mM NaCl

Waschpuffer 1
50 mM Natriumphosphat, pH 8,0
500 mM NaCl
20 % (v/v) Glycerol
5 mM Imidazol
0,1 % (v/v) Tween 20

Waschpuffer 2
0,5 % (v/v) Triton X-100
50 mM Natriumphosphat, pH 8,0
300 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerol

Elutionspuffer	5 mM Imidazol
	50 mM Natriumphosphat, pH 8,0
	300 mM NaCl
	10 % (v/v) Glycerol
Regenerationspuffer	200 mM Imidazol
	20 mM MES, pH 5,0
	100 mM NaCl
Lagerungslösung	20 % (v/v) Ethanol

Alle Lösungen wurden steril filtriert, entgast und bei 4°C gelagert.

Puffer, Lösungen und Gele für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese

TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris-Base
	1 mM EDTA
	pH 8,3
Sammelgel	5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1
	190 mM Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (v/w) SDS
	0,1 % (v/w) Ammoniumpersulfat
	0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel	12 / 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1
	390 mM Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (v/w) SDS
	0,1 % (v/w) Ammoniumpersulfat
	0,04 % (v/v) TEMED
Lade-Puffer, reduzierend	60 mM Tris-HCl, pH 8,8
	2% (v/w) SDS
	0,003% (v/w) Bromphenolblau
	5% (v/v) Glycerol
	1,5% (v/w) DTT
Lade-Puffer, nicht reduzierend	60 mM Tris-HCl, pH 8,8
	2% (v/w) SDS

	0,003% (v/w) Bromphenolblau
	5% (v/v) Glycerol
	5 mM Iodacetamid
10 x Laemmli-Puffer	250 mM Tris-Base
	200 mM Glycin
	0,1% (v/w) SDS
	pH 8,3
Elektrophorese-Blotpuffer	25 mM Tris-Base
	0,2 M Glycin
	20% (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,1% (v/v) Coomassie Brilliant-Blau R-250
	7% (v/v) Essigsäure
	30% (v/v) Ethanol
	filtriert
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v) Ethanol
	7% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Fixierer	7% (v/v) Essigsäure
	2% (v/v) Glycerol

5.1.4 Puffer und Lösungen für DNA-Experimente

DEPC behandeltes Wasser	0,1% (v/v) DEPC in destilliertem Wasser, autoklaviert
-------------------------	---

Puffer, Lösungen und Agarosegele für die Elektrophorese

6 x DNA-Probenpuffer	0,25 % (v/w) Bromphenolblau
	30 mM EDTA, pH 8,0
	30% (v/v) Glycerol
10 x TBE (Tris-Borat, EDTA)	1 M Tris-HCl, pH 8,3
	1 M Borsäure
	20 mM EDTA
	pH 8,3
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser

VHH31SB	5 ' CCCAAGACATGCCGTACGAACTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGC3 '
9E10VHG52SB	5 ' GGGTGTAGGTACCACGTGAAGAGATGGTTGCGACCCATCC3 '
9E10VHG52SF	5 ' GGAGTGGGTCGCACCATCTCTTCACGTGGTACCTACACCC3 '
VHS100hY9E10B	5 ' GGAGACGGTGACCGAGGCTCCTTGGCCCCAGTAGTCCATGCATAG TAATAG3 '
VLI30PstI	5 ' CCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGGCATCT CTTTTATGAACTGG3 '
VLA51B	5 ' GGTGGATGCAGCATAGATGAGG3 '
VLI51A/R54QFor	5 ' p-CTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGCTCC3 '
VLM78T83S91B	5 ' TTTGATCTCGAGCTTGGTGCCGCCGCCGAACGTCCACGGAACCTC CTTGATTGCTGACAGAAATACATTGCAGTATCATCCTCCTCCATAG GATGG3 '
VLT91SF	5 ' p-GTCAGCAATCCAAGGAGGTTCCGTGG3 '
VH2H/Yfor (Griebel, 2005)	5 ' TGGTACTTACACGTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGACGA3 '
VH2R/Gfor (Griebel, 2005)	5 ' TTGGTTCCGGAGGTACTTACACCCACTATCCAGACAGTGT3 '
H/Yfirstfor (Griebel, 2005)	5 ' GTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTCGC AACCATTGGTAGTCGTGGTACTTACACGTACTATC3 '
R/Gfirstfor (Griebel, 2005)	5 ' GTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGAAGTGGGTCGC AACCATTGGTTCCGGAGGTACTTAC3 '
9E10-2ndfor (Griebel, 2005)	5 ' CTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTCACTAT GGCATGTCTTGGGTTGCCAGACTC3 '
9E10-3rdfor (Griebel, 2005)	5 ' GAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGA GGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC3 '

Die Mutageneseprimer VLI30PstI und VLA51B sind Gel filtriert, alle anderen mittels HPLC gereinigt. Die hier aufgelisteten Oligonukleotide sind von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH hergestellt worden und im mit DEPC behandelten Wasser, wie vom Hersteller empfohlen, gelöst.

5.1.6 Synthetische Peptide

myc-tag-Peptid	NH ₂ -EQKLISEEDLN-COOH	Thermohybid, Ulm
biotinyliertes myc-tag Peptid	Biotin-GGEQKLISEEDLN-COOH	Rudolf Volkmer, Charité-Universitätsmedizin Berlin
Cys-myc-tag-Peptid	NH ₂ -CGGEQKLISEEDLN-COOH	Peter Henklein, Charité-Universitätsmedizin Berlin
c-myc(408-427)-Peptid	NH ₂ -AEEQKLISEEDLLRKRREQL-COOH	Peter Henklein, Charité-Universitätsmedizin Berlin
Cys-c-myc(408-427)-Peptid	NH ₂ -CAEEQKLISEEDLLRKRREQL-COOH	Peter Henklein, Charité-Universitätsmedizin Berlin
randomisiert, basierend auf c-myc(408-427)-Peptid	NH ₂ -LDIKLQERESRKLQRQEEAEL-COOH	Peter Henklein, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Alle Peptide sind HPLC gereinigt, massenspektrometrisch analysiert und weisen einen Reinheitsgrad von mindestens 85% (Thermohybid) bzw. 70-75% auf.

5.1.7 Plasmid und Bakterienstämme

Plasmid

<i>Plasmid</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Herkunft</i>
pASK85-9E10	Tet ^{p/o} , anti-humanes-c myc 9E10-VH- und VL-Gen, γ1-His6, κ, OmpA- und PhoA-Signalpeptide, fl ori, Amp ^R , ColEI ori	pASK85: A. Skerra (1994) 9E10-Klonierung: U. Griebel (2005)

Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Herkunft</i>
JM83	F ⁻ ara, Δ(pro-lac), rpsL, thi, Φ80lacZΔM15, λ ⁻	A. Skerra (TU München)
XL-1-Blue	supE44, endA1, recA1, hsdR17, gyrA46, thi-1, relA1 lac ⁻ , lac [F ^c proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10(tet ^r)]	Stratagene
BL21-Gold	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ⁺ Hte ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal endA Tet ^r	Stratagene

5.1.8 Kits, Proteine und sonstige Substanzen

Kits

QIAprep Spin-Plasmidkit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel-Extraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungs-Kit	Qiagen, Hilden
Biacore Thiol-Kopplungs-Kit	Biacore, Uppsala, Schweden

Restriktionsendonukleasen

Afl III	NEB (New England Biolabs)
Apa I	Boehringer Mannheim
Bsi WI	NEB
Bsp EI	NEB
Bst EII	NEB
Eco RI	NEB
Hind III	Boehringer Mannheim
Kpn I	NEB
Nco I	Boehringer Mannheim
Pst I	NEB
Sfa NI	NEB
Sty I	Boehringer Mannheim
Xba I	Boehringer Mannheim
Xho I	NEB
Xho II	NEB

Polymerasen und Ligase

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
T4-Ligase	Roche
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Quantum

Antikörper und sonstige Proteine

anti-c-myc-9E10-Fab	Hybridom, G. Winter, Cambridge, Expression und Reinigung, H. Tanzmann u. Ch. Scholz, Charité, Berlin
anti-His(6)-tag-HRP-Konjugat	Upstate
anti-Maus-IgG1-kappa-HRP-Konjugat	DPC Biermann, Bad Nauheim
anti-Maus-Ig-HRP-Konjugat	Amersham Life Science
anti-Maus-IgG(Fab)-HRP-Konjugat	Sigma-Aldrich
Molekularmassenmarker Rainbow low/high	Amersham Life Science
ImmunoPure Avidin	Pierce
Lysozym	Sigma-Aldrich

Sonstige Substanzen

2-Log DNA Ladder	NEB
Smart DNA Ladder	Eurogentec
UP99619 Uptilight HRP Blot-Substrat	Interchim
Gelafusal	Biotest Pharma, Dreieich
10 x <i>Spots Blocking Buffer</i>	Sigma-Aldrich
Talon (Co ²⁺ -Sephrose)	Clontech
TMB Substrat-Lösung Seramunblau	Seramun, Dolgenbrodt

5.2 Methoden

5.2.1 Herstellung der 9E10-Rückmutanten

5.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR

Die Rückmutationen in den variablen Regionen des 9E10 im pASK85 (Griebel, 2005) wurden mit Hilfe der PCR durch Einbau der gewünschten Punktmutationen in den PCR-Primer erzielt. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt. Erstens, Amplifikation einzelner DNA-

Fragmente mit anschließendem Einbau in den Vektor und zweitens, Amplifikation des gesamten pASK85-Vektors.

1. Amplifikation einzelner DNA-Fragmente aus dem pASK85-9E10

Der in Tabelle 5.1. angegebene allgemeine PCR-Ansatz wurde für ein Reaktionsvolumen von 100 µl zusammengestellt.

Tabelle 5.1. : PCR-Ansatz und Syntheseprogramm für die Herstellung der Konstrukte H^{H31}S, G^{H52}S, S^{H100h}Y, F^{L30}I, L_{Keimbahn} und H_{Keimbahn}.

PCR-Ansatz:

	Endkonzentration
DEPC behandeltes H ₂ O	ad 100 µl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1 x
dNTPs (10 mM jedes)	200 µM jedes
Primer I (10 pmol/µl)	0,5 µM
Primer II (10 pmol/µl)	0,5 µM
<i>Taq</i> / <i>Pfu</i> -Gemisch (20 U : 1 U)	0,02 U/µl
pASK85-9E10 (100-200 ng/µl)	1-2 ng/µl

Syntheseprogramm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung 95°C	2 min	1
Denaturierung 95°C	60 sec	30
Annealing 50°C	60 sec	
Synthese 72°C	60 sec	
Endsynthese 72°C	5 min	1

Nachdem die Ansätze mit einem Tropfen Paraffinöl verschlossen worden waren, wurde die Synthese der DNA in einem Thermocycler (VARIUS TCV 5*9 von LANDGRAF, Hannover) nach dem Syntheseprogramm in Tabelle 5.1. gestartet. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde ein Kontrollansatz ohne Vektor mitgeführt.

Für die Herstellung der Rückmutanten H^{H31}S, G^{H52}S, S^{H100h}Y, F^{L30}I, L_{Keimbahn} und H_{Keimbahn} wurden die in Tabelle 5.2. aufgeführten Primer genutzt. Die Amplifikation einzelner Genabschnitte bzw. ganzer Gene aus dem pASK85-9E10 erfolgte in einer bzw. zwei PCR-Reaktionen nach dem PCR-Ansatz und dem Syntheseprogramm in Tabelle 5.1.. Die Einzelmückmutanten R^{H53}G, H^{H58}Y wurden in vier aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen

nach dem PCR-Ansatz und dem Syntheseprogramm der Tabelle 5.1. hergestellt. In den Tabellen 5.3. und 5.4 werden Angaben zu den verwendeten Primern, der Templatmenge, der Annealingtemperatur im Thermocycler sowie der Größe der amplifizierten Fragmente in jeder PCR-Reaktion gemacht. Im Anschluss daran erfolgten die Trennung der PCR-Proben mittels Agarosegelelektrophorese und die Isolation der gewünschten DNA-Banden aus dem Gel (Tabellen 5.3. - 5.4.) mit dem QIAquick Gel-Extraktionskit des Herstellers Qiagen.

Tabelle 5.2.: In der PCR eingesetzte Primer für die Herstellung der Konstrukte $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $S^{H100h}Y$, $F^{L30}I$, $L_{Keimbahn}$ und $H_{Keimbahn}$ und Größe der amplifizierten DNA-Fragmente.

<i>Konstrukt</i>	<i>Primer für PCR 1.</i>	<i>Endprodukt</i>	<i>Primer für PCR 2.</i>	<i>Endprodukt</i>
$H^{H31}S$	pASKVHFor, VHH31Sback	207 bp	9E10oriBstEIIB, VhH31SFor	317 bp
$G^{H52}S$	pASKVHFor, 9E10VHG52SB	266 bp	9E10oriBstEIIB, 9E10VHG52SF	247 bp
$S^{H100h}Y$	pASKVHFor VHS100hY9E10B	470 bp	/	/
$F^{L30}I$	VLI30PstI VLHpaIkorB	ca. 300 bp	/	/
$L_{Keimbahn}$	VLI30PstIF VLA51B	113 bp	VLI51A/R54QFor VLM78T83S91B	184 bp
$H_{Keimbahn}$	XbaIH3Qfor VHCDR2germB Template: pASK85- 9E10(VHH31S)	304 bp	VHFR3germF VHCDR3FR4germB	187 bp

Tabelle 5.3. : Herstellung von $R^{H53}G$

<i>PCR</i>	<i>Primer</i>	<i>Template</i>	<i>Annealingtemperatur</i>	<i>Endfragment</i>
1.	9E10oriBstEIIB VH2R/Gfor		55 °C	230 bp
2.	9E10oriBstEIIB R/Gfirstfor	2 µl PCR 1. Produkt	50 °C	280 bp
3.	9E10oriBstEIIB 9E102ndfor	2 µl PCR 2. Produkt	48 °C	330 bp
4.	9E10oriBstEIIB 9E103rdfor	20 µl PCR 3. Produkt	48 °C	381 bp

Tabelle 5.4. : Herstellung von $H^{H58}Y$

PCR	Primer	Template	Annealingtemperatur	Endfragment
1.	9E10oriBstEIIB VH2H/Yfor		50 °C	220 bp
2.	9E10oriBstEIIB H/Yfirstfor	2 µl PCR 1. Produkt	40 °C	280 bp
3.	9E10oriBstEIIB 9E102ndfor	5 µl PCR 2. Produkt	48 °C	330 bp
4.	9E10oriBstEIIB 9E103rdfor	20 µl PCR 3. Produkt	48 °C	381 bp

Die Primer sind von U. Griebel charakterisiert und bereitgestellt worden (Griebel, 2005).

Die PCR-Produkte zur Synthese der Konstrukte $R^{H53}G$, $H^{H58}Y$, $S^{H100h}Y$ und $F^{L30}I$ waren nun für den Restriktionsverdau und den Einbau in den pASK85-9E10 fertig. Die einzeln amplifizierten DNA-Fragmente für die Synthese von $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $L_{Keimbahn}$ und $H_{Keimbahn}$ mussten für den Einbau in den Vektor über die Restriktionsschnittorte XbaI/BstEII für V_H und PstI/XhoI für V_L zu einem Fragment assembliert werden. In einer Agarosegelelektrophorese wurden die Konzentrationen der gereinigten DNA-Fragmente 207 und 317 bp ($H^{H31}S$ -Synthese) und der Fragmente 266 und 247 bp ($G^{H52}S$ -Synthese) durch Auftrennung von 0,1, 0,3 und 1 µl der Proben abgeschätzt. Die PCR-Ausbeuten der gereinigten Fragmente 207 und 317 bp betrugen jeweils ca. 1,5 µg und die der Fragmente 266 und 247 bp schätzungsweise 1,5 µg bzw. 480 ng. Die Ausbeuten der Banden 113 und 184 bp zur Synthese von $L_{Keimbahn}$ lagen bei jeweils 150 ng, die der Banden 304 und 187 bp zur Synthese von $H_{Keimbahn}$ bei jeweils 360 ng.

Die gereinigten und zum Teil komplementären PCR-Produkte 1. und 2. für die Synthese der Rückmutanten $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $L_{Keimbahn}$ und $H_{Keimbahn}$ wurden in einer Assemblierungs-PCR (Tabellen 5.5. und 5.6.) zu einem Fragment zusammengeführt und mit den Primerpaaren pASKVHFOR/9E10oriBstEIIB ($H^{H31}S$, $G^{H52}S$), VLI30PstIF/VLM78T83S91B ($L_{Keimbahn}$) und XbaIH3QFor/VHCDR3FR4germB ($H_{Keimbahn}$) vervielfältigt. Dafür mussten die Fragmente äquimolar in der Assemblierungsreaktion eingesetzt werden. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne die Produkte aus der PCR 1. und 2. mitgeführt. Nach wiederholter Auftrennung der amplifizierten Assemblierungsprodukte im Agarosegel wurden die DNA-Fragmente einer Größe von 479 bp ($H^{H31}S$ und $G^{H52}S$), 275 bp ($L_{Keimbahn}$) und 472 bp ($H_{Keimbahn}$) mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraktionskits isoliert.

Tabelle 5.5. : Ansatz für eine Assemblierungs-PCR zur Herstellung der Konstrukte $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $L_{Keimbahn}$ und $H_{Keimbahn}$.

Assemblierung:

<i>Mix 1</i>	<i>Endkonzentration</i>
DEPC behandeltes H_2O	ad 50 μl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1 x
dNTPs (10 mM jedes)	200 μM jedes
Produkt aus PCR 1.	ca. 2 ng/ μl
Produkt aus PCR 2.	ca. 2 ng/ μl
<i>Taq/Pfu</i> -Gemisch (20:1)	0,02 U/ μl

PCR:

<i>Mix 2</i>	<i>Endkonzentration</i>
DEPC behandeltes H_2O	ad 50 μl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1 x
dNTPs (10 mM jedes)	400 μM jedes
Primer I (10 pmol/ μl)	1 μM
Primer II (10 pmol/ μl)	1 μM
<i>Taq/Pfu</i> -Gemisch (20:1)	0,04 U/ μl

Tabelle 5.6. : Syntheseprogramm für die Assemblierungs-PCR. * 40°C für die Synthese von $L_{Keimbahn}$ und $H_{Keimbahn}$.

Syntheseprogramm:

<i>Mix 1</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	60 sec	7
Annealing	57°C*	30 sec	
Synthese	72°C	120 sec	
<i>Zugabe von Mix 2</i>	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	60 sec	25
Annealing	54°C*	60 sec	
Synthese	72°C	60 sec	
Endsynthese	72°C	5 min	1

Für den Einbau in den pASK85-9E10 wurde das gesamte aus dem Agarosegel extrahierte PCR-Produkt zur Synthese von $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $S^{H100h}Y$ und $H_{Keimbahn}$ mit den Restriktionsenzymen BstEII/XbaI zur Synthese von $R^{H53}G$ und $H^{H58}Y$ mit SexAI/BstEII und zur Synthese von $F^{L30}I$ und $L_{Keimbahn}$ mit PstI/XhoI nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers verdaut. Die Ausbeuten nach dem Verdau lagen bei 1,5 μg ($H^{H31}S$), 0,6 μg ($G^{H52}S$), 2,4 μg ($S^{H100h}Y$), 0,5 μg ($R^{H53}G$), 0,9 μg ($H^{H58}Y$), 0,15 μg ($F^{L30}I$), 0,3 μg ($L_{Keimbahn}$) und 1,2 μg ($H_{Keimbahn}$) gereinigter DNA. Der pASK85-9E10 wurde aus den XL-1-Zellen nach dem Protokoll von Qiagen (QIAprep Spin-Plasmidkit) isoliert und entsprechend der einzubauenden Kassette mit Restriktasen verdaut. Dieses ergab eine Ausbeute von ca. 6 μg Vektor-DNA nach dem Verdau mit PstI/XhoI und SexAI/BstEII bzw. ca. 9 μg Vektor-DNA nach dem Verdau BstEII/XbaI.

2. Amplifikation des gesamten pASK85-9E10

Die Amplifikation des gesamten Vektors mit nur einem mutierten Primer ermöglichte eine schnelle Herstellung des Konstruktes pASK85-9E10(T^{L91}S). Eine PCR-Reaktion wurde nach dem folgenden Ansatz mit dem 5' phosphorylierten Primer VLT91SF und dem frisch aus den XL-1-Zellen isolierten pASK85-9E10 durchgeführt (Tabelle 5.7.).

Tabelle 5.7. : PCR-Ansatz und Syntheseprogramm zur Herstellung des Konstruktes T^{L91}S.

PCR-Ansatz:

	Endkonzentration
DEPC behandeltes H ₂ O	ad 100 µl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1 x
dNTPs (10 mM jedes)	500 µM jedes
VLT91SF (10 pmol/µl) bzw. Kontrolle ohne Primer	1 µM
<i>Taq</i> / <i>Pfu</i> -Gemisch (20:1)	0,08 U/µl
pASK85-9E10 (100-200 ng/µl)	2-3 ng/µl

Syntheseprogramm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung 95°C	1 min	1
Annealing 50°C	2 min	
Synthese 72°C	2 min	
Denaturierung 94°C	1 min	8
Annealing 54°C	2 min	
Synthese 72°C	1 min	
Endsynthese 72°C	5 min	1

Anschließend erfolgte die Reinigung des PCR-Produkts mit dem QIAquick PCR-Reinigungskit, dann die Abtrennung der DNA von den QIASäulen mit 30 µl Elutionspuffer und zum Schluss die Verbindung der neu synthetisierten DNA zu einem Strang mit der T4-DNA-Ligase in einem Ansatz von 30 µl. Das nun aus einem parentalen und neu synthetisierten Strang bestehende Plasmid wurde dann mit DpnI inkubiert, was zu einem Verdau des methylierten parentalen Stranges führte. (Tabelle 5.8.). Ein Kontrollansatz ohne den Primer VLT91SF wurde zum Vergleich dem gleichen Procedere unterzogen.

Tabelle 5.8. : Ansatz für die Ligation der DNA und für den Verdau der methylierten parentalen DNA für die Herstellung von T^{L91}S.

	<i>Menge</i>
PCR-Produkt / Kontrolle	25 µl
10 x Ligase Puffer	3 µl
T4-DNA-Ligase 1 U/µl	2 U
1,5 h 37°C und 10 min 65°C	
DpnI 10 U/µl	10 U
30 min 37°C	

5.2.1.2 Ligation in pASK85-9E10

Der Einbau der mutierten DNA-Kassetten in den pASK85-9E10 erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers in 10 µl Ansätzen mit 70-140 ng Gesamt-DNA im Verhältnis 1,3 : 1. Zur Kontrolle wurden Ansätze mit dem verdauten Vektor ohne die mutierte DNA-Kassette mitgeführt. Die Konstruktion von L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} im pASK85 war durch den Einbau der L_{Keimbahn}-Kassette, die zuvor mit PstI/XhoI aus dem pASK85-9E10(L_{Keimbahn}) herausgeschnitten worden war, in den mit gleichen Restriktasen verdauten pASK85-9E10(H_{Keimbahn})-Vektor möglich.

5.2.1.3 Transformation in superkompetente XL-1-Zellen

Die Transformation der superkompetenten XL-1-Zellen von Stratagene mit dem pASK85-9E10(x) (x = Rückmutante z. B. H^{H31}S) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die durchschnittliche Transformationseffizienz der auf LB-Agarselektionsplatten (100 µg/ml Amp) ausplattierten Zellen lag bei 10⁶ - 10⁸ Kolonien (cfu = *colony forming units*)/µg DNA. Für die Transformation von pASK85-9E10(T^{L91}S) wurden 2 µl des DpnI verdauten Ansatzes (bzw. Kontrollansatz) mit 100 µl XL-1-Zellen vermischt, und es wurde weiter nach Protokoll verfahren.

5.2.1.4 Selektion der mutierten DNA

Sechs separat wachsende Klone wurden nach jeder Transformation von den Selektionsplatten gepickt und in 5 ml LB (200µg/ml Amp) bei 37°C über Nacht angezogen. Später wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin-Plasmidkits aus den Zellen isoliert, wobei ein anderer Teil der Zellen zuvor entnommen und in 10% Glycerin bei -70°C in NUNC-Kryoröhrchen eingefroren wurde. Die mutierten variablen Regionen des 9E10 im pASK85 wurden über einen für jede Rückmutante spezifischen Restriktionsverdau identifiziert. Der Verdau mit den Enzymen in Tabelle 5.9. wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und durch eine Agarosegelelektrophorese belegt. Die Kontrolle des Restriktionsverdaus erfolgte mit pASK85-9E10.

Tabelle 5.9. : Identifikation der mutierten Regionen in den Plasmiden pASK85-9E10(x) mit Restriktionsenzymen.

<i>pASK85-9E10(x)</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>pASK85-9E10(x)</i>	<i>Restriktionsenzym</i>
H ^{H31} S	Bsi WI	F ^{L30} I	Sfa NI
G ^{H52} S	Kpn I	T ^{L91} S	Sty I
R ^{H53} G	Bsp EI	L _{Keimbahn} /H _{9E10}	Xho II
H ^{H58} Y	Afl III	L _{9E10} /H _{Keimbahn}	Afl III und Eco RI
S ^{H100h} Y	Sty I	L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	Xho II und Afl III

Zellen mit der jeweiligen rückmutierten 9E10-DNA im pASK85 wurden aufgetaut, in 5 ml LB (100 µg/ml Amp) bei 37°C auf dem Schüttler über Nacht angezogen und im analytischen Maßstab auf Expression der mutierten Gene getestet. Nicht mit dem Vektor transformierte Zellen wurden ohne Amp kultiviert und dienten der Kontrolle. Den Übernachtskulturen wurden 500 µl entnommen und 10 ml frischem LB-Medium (100 µg/ml Amp) zugeimpft. Die Zellen wuchsen bei 37°C bis zur einer OD_{600nm} = 0,5 auf dem Schüttler und wurden anschließend mit 0,2 µg/ml aTc bei 22°C für 2,5 h inkubiert. Nach der Expression wurden die Zellen bei 5000 x g für 5 min in der Zentrifuge geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl Periplasmapuffer auf Eis 30 min lang inkubiert. Zum Schluss wurde die lösliche Fraktion von der unlöslichen des periplasmatischen Aufschlusses durch Zentrifugieren (25000 x g, 20 min, 4°C) getrennt. Die unlösliche Fraktion wurde in 100 µl TE-Puffer gegeben und bei 95°C für 10 min im 5 x Ladepuffer (nicht reduzierend) für Analysen mittels SDS-PAGE inkubiert.

Weitere Analysen für den Nachweis der synthetisierten Fab-Fragmente erfolgten in der SDS-PAGE und im Western-Blot.

Das V_H- bzw. V_L-Gen in den Plasmiden von Zellklonen mit positiven Ergebnissen in den Restriktions- und Expressionsexperimenten wurde zur Kontrolle sequenziert.

5.2.1.5 Sequenzierung der DNA

Die Kontrollsequenzierungen der variablen Regionen des 9E10 und seiner Rückmutanten im pASK85 erfolgten mit den Sequenzierungsprimern pASK85OmpA und pASK88NcoIFOR und waren Teil einer Dienstleistung von Martin Meixner am ABI373 BIGDYE-TERMINATOR (HU Berlin). Im Fall von pASK85-9E10(T^{L91}S) wurden die schwere und leichte variable Region sequenziert, während bei den restlichen Konstrukten nur die jeweils mutierte variable Region der Sequenzierung unterzogen wurde.

5.2.2 Präparative Fab-Synthese in *E. coli*

5.2.2.1 Fab-Expression

50-100 ng des Vektors pASK85-9E10(x) wurden in CaCl₂ kompetente XL-1-Zellen transformiert (5.2.6.), die Zellen auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Amp ausplattiert und bei 37°C für 16 h inkubiert. Anschließend wurden 50 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Amp mit einem separat wachsenden Klon von der Agarplatte angeimpft und bei 30 °C für 22 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 5000 x g 10 min zentrifugiert und in 50 ml frischen LB-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 2 x 2000 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Amp aufgeteilt und einer nachfolgenden Kultivierung für 18 h bei 22°C auf einem Schüttler unterzogen. Die Induktion der Fab-Expression wurde durch Zugabe von aTc auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/ml bei einer OD_{600nm} = 0,8 der Zellkultur gestartet und bei gleicher Temperatur für 2,5 h geschüttelt.

5.2.2.2 *Fab-Isolierung aus dem Periplasma*

Die geernteten Zellen (5000xg, 10 min, 4°C) wurden in 40 ml kaltem Periplasmapuffer aufgenommen und auf Eis 30 min lang inkubiert. Der osmotische Schock bewirkt eine Freisetzung der löslichen periplasmatischen Bestandteile der Zelle. Die lösliche Fraktion des Periplasmaaufschlusses wurde bei 4°C in zwei Schritten von der unlöslichen Fraktion, die aus den Sphäroplasten und den unlöslichen Bestandteilen des Periplasmas besteht, mittels Zentrifugation (5000 x g, 10 min und 25000 x g, 20 min) getrennt und bei 4°C gegen den Equilibrierungspuffer der chromatographischen Säule in Schläuchen (Visking) mit einer Ausschlussgrenze von 12 kD über Nacht dialysiert. Der abschließend nochmals zentrifugierte Überstand der Probe (25000 x g, 20 min bei 4°C) war nun bereit für die anschließende Affinitätschromatographie.

5.2.2.3 *In vitro Fab-Rückfaltung*

Ziel der *in vitro* Rückfaltung war es, die Fab-Ausbeuten zu steigern, wofür die Zellen in 2 x 500 ml Flüssigmedium, wie oben beschrieben, kultiviert und nach der Expression geerntet wurden. Der komplette Zellaufschluss erfolgte in 10 ml Zelllysepuffer auf Eis mit Hilfe einer Ultraschallsonde (6 min, höchste Stufe, Labsonic U, Braun). Die Probe wurde dann bei 25000 x g 20 min bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde gegen 5 l 50 mM Tris-HCl versetzt mit 2 mM EDTA (pH 8,0) bei 4°C über Nacht dialysiert (Visking 12 kD MWCO). Das Pellet aus der Zentrifugation wurde zweimal in 10 ml Waschpuffer A. und einmal in 10 ml Waschpuffer B. 30 min gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten eine Zentrifugation erfolgte (25000 x g, 1 h, 4°C). Das gewaschene Pellet, das unter anderem die Einschlusskörperchen enthält, wurde mit dem dialysierten Überstand, der einen großen Teil der leichten Kette beinhaltet, vereinigt und 1 h nach Zugabe von Guanidin-Hydrochlorid auf 6 M und DTT auf 10 mM Endkonzentration in 20 ml Endvolumen bei RT gerührt. Das DTT im Ansatz wurde im zweifachen Dialyseschritt (24 h) bei 4°C gegen 1 l 6 M Guanidin-Hydrochlorid pH 5,5 verdünnt. Die denaturierte Proteinprobe wurde nun gegen 5 l Renaturierungspuffer 160 h bei 10°C und für 24 h gegen PBS dialysiert. Die lösliche Fraktion mit dem rückgefalteten Protein konnte durch zweifache Zentrifugation (25000 x g, 30 min und 1 h) von dem Präzipitat getrennt werden und war anschließend vorgefertigt für die

Reinigung. Ein Teil der in dieser Arbeit charakterisierten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ Fab-Konstrukte wurde von Ch. Scholz im größeren Maßstab in *E. coli* exprimiert, aus Einschlusskörperchen rückgefaltet und gereinigt.

5.2.3 Reinigung von Fab mittels Metallaffinitätschromatographie

Die Reinigung der 9E10 $H^{H31}S$ Fab-Fragmente erfolgte über die Immobilisierung des His-tag an Co^{2+} -Sephrose (Talon) an einer Chromatographieranlage von Pharmacia bei 4°C. Das Volumen der Talon-Säule betrug 2 ml und wies eine Proteinbindekapazität von 5 mg auf. An der Chromatographieranlage wurde das Verhalten der Fab-Fragmente getestet, des Weiteren wurden die Reinigungsbedingungen optimiert. Die Reinigung der übrigen Fab-Rückmutanten als auch des rekombinanten 9E10-Fab erfolgte identisch unter den optimierten Bedingungen für die Reinigung des 9E10 $H^{H31}S$ -Fab, jedoch an selbst hergestellten Säulen, bestehend aus einer 15 ml Einwegspritze (Sarstedt) und Filtern (HR16, Pharmacia). Die selbst hergestellten Säulen wurden über eine Pumpe betrieben. Die Reinigung an den selbst hergestellten Talon-Säulen mit einem Volumen von 0,6 ml und einer Proteinbindekapazität von 1,5 mg erlaubte eine schnellere und parallele Reinigung der Fab-Konstrukte. Nach dem Auftragen der dialysierten Proben auf die vorequilibrierte chromatographische Säule und dem Waschen der Säule wurde das Protein mit 200 mM Imidazol im Elutionspuffer von der Säule eluiert (Tabelle 5.10.). Das Eluat wurde gegen 5 l PBS bei 4°C für 20 h dialysiert, durch Zentrifugation (Centricon 30 kD MWCO) eingeeengt, und die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde mit dem Programm Vector NTI für jedes Konstrukt die Konzentration an Fab errechnet, die bei 280 nm eine Absorption von 1 ergibt (Tabelle 5.11.).

Die gereinigten Fab-Fragmente wurden abschließend in einer SDS-PAGE und in einem Western-Blot (5.2.6.) charakterisiert und bei -20°C gelagert. Die ELISA-, SPR- und Peptidspot-Analysen (5.2.4.) belegten zudem die Funktionalität der gereinigten Fragmente.

Tabelle 5.10. : Reinigungsschema. *¹Die Mengenangaben beziehen sich auf die Reinigung der Proben mit selbst hergestellten Säulen. *²Zeigt den Waschpuffer für eine Reinigung an der Chromatographieanlage und *³ die Waschpuffer für eine Reinigung an selbst hergestellten Säulen.

<i>Schritt</i>	<i>Puffer</i>	<i>Geschwindigkeit</i>	<i>Dauer / Menge</i> ^{*1}
Equilibrierung	Equilibrierungspuffer	0,5 ml/min	40 min / 10 ml
Beladen mit der Probe	Probe im Equilibrierungspuffer	0,3 ml/min	über Nacht (ca. 15 h) zirkulierend
Waschen	Waschpuffer 2 ^{*2}	0,5 ml/min	bis OD _{280nm} an Basislinie
	Waschpuffer 1 ^{*3}	0,5 ml/min	1 x 10 ml
	Waschpuffer 2 ^{*3}	0,5 ml/min	3 x 10 ml
Elution	Elutionspuffer	0,5 ml/min	Änderung der OD _{280nm} / 5 ml
Regeneration	Regenerationspuffer destilliertes Wasser Lagerungslösung	0,5 ml/min	80 min / 2 x 10 ml 40 min / 10 ml 30 min / 5 ml

Tabelle 5.11. : Absorption der Fab-Fragmente bei 280 nm.

<i>Fab</i>	<i>I A(280 nm)</i>
L ^{9E10} /H _{Keimbahn} , L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	0,59 mg/ml
9E10, H ^{H31} S, G ^{H52} S, R ^{H53} G, F ^{L30} I, T ^{L91} S, L _{Keimbahn} /H _{9E10}	0,61 mg/ml
H ^{H58} Y, S ^{H100h} Y	0,6 mg/ml

5.2.4 Biochemische Charakterisierung von 9E10-Fab und Rückmutanten

5.2.4.1 Peptidspot-Analysen

Die Methode der parallelen chemischen Synthese von Peptidspots auf Zellulosemembranen (Frank et al., 1991, Frank, 1992) wurde verwendet, um mit Hilfe solcher Peptidspots die Bindung des 9E10-Fab und seiner rückmutierten Fab-Fragmente an humane c-myc-Peptide mit unterschiedlicher Länge als auch an Einzel- und Mehrfachsubstituenten des myc-Peptides

zu charakterisieren. Peptidsynthese und Bindungsstudien wurden auf ein und derselben Membran durchgeführt. Hierfür wurden die Peptide von Gerd Hansen in der Arbeitsgruppe von W. Höhne nach der Methode der Spotsynthese (Frank 1996; Kramer 1998) an *Whatman 50 Cellulose* (Whatman, Mainstone, England) sequentiell vom C- zum N-Terminus am Auto-Spot Roboter ASP 222 (Abimed) synthetisiert. Die schrittweise Kopplung der Aminosäuren der Peptide an gewählten Positionen der Membranen (Spots) erfolgte nach dem Prinzip der Säureamidausbildung mit einem an Zellulose veresterten β -Alanin₍₂₎-Linker. Um die für die Bindung kritischen Seitenreste identifizieren zu können, wurden Substitutionsanalysen an den Peptiden durchgeführt, wofür jeweils eine Aminosäure an jeder Position des Peptides durch die zwanzig proteinogenen L-Aminosäuren ausgetauscht wurde und wo pro Peptidspot ein Austausch stattfand. Auf der Membran erscheint in der äußeren linken Spalte und nochmals in jeder Zeile (Höhe) die Wildtypsequenz.

Bindungsassays

Für die Bindungsanalysen wurden die Peptidspotmembranen je 5 min in 96% Ethanol, destilliertem Wasser und im TTBS-Peptidspotpuffer vorbehandelt. Die Blockierung der freien Bindungsflächen auf der Membran erfolgte mit 2 x *Spots Blocking Buffer* in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem dreifachen Waschschrift für 5 min in TTBS fand die Inkubation mit 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten) und einem HRP-gekoppelten anti-Maus-Ig (1:500) in 6 ml TTBS und 3 % Gelafusal für 1,5 Stunden bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ statt. Die Mengen an eingesetztem Fab variierten zwischen 6 bis 220 μg und 3,5 mg für das *in vitro* rückgefaltete H_{Keimbahn}/L_{Keimbahn}-Fab. Nachdem die behandelten Membranen nach oben beschriebener Prozedur gewaschen und in 4 ml Chemilumineszenz-Substratlösung, basierend auf Luminol (Uptilight HRP Blot-Substrat), kurz geschwenkt wurden, erfolgte die Detektierung der Bindungssignale über die chemilumineszente Reaktion der immobilisierten Peroxidase am LumiImager (Boehringer Mannheim, Mannheim). Die Auswertung der Signale fand mit den Programmen Lumi Analyst Version 3.0 und ImageJ (www.rsb.info.nih.gov/ij) statt. Vergleichende Analysen zum Bindungsverhalten der Rückmutanten und des 9E10-Fab wurden unter gleichen Bedingungen und auf Peptidspotmembranen aus einer Synthesecharge durchgeführt. Variationen in den Konzentrationen der eingesetzten Fabs sind auf die Affinität der Fabs und Empfindlichkeit dieser Methode zurückzuführen. In Kontrollexperimenten zur Bindung des Nachweisantikörpers an die Peptide wurden die Peptidspotmembranen, wie oben beschrieben, jedoch ohne Fab, mit dem HRP-gekoppelten anti-Maus-Ig inkubiert. Die

Lumineszenzreaktion wurde 10 min lang detektiert. In den Experimenten zur Reproduzierbarkeit der Bindungsintensitäten in den Substitutionsanalysen wurden 22 µg des periplasmatisch löslichen L_{Keimbahn}/H_{9E10}-Fab und 130 µg des *in vitro* rückgefalteten Fab eingesetzt.

5.2.4.2 K_D -Bestimmung im ELISA

Die synthetischen Peptide myc-tag und c-myc(408-427) wurden auf ihre Bindung an das 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten) in Lösung getestet (Friguet, 1985). Mikrotiterplatten (Nunc) wurden mit 5 µg/ml Avidin in 50 mM Beschichtungspuffer beschichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit Waschpuffer fünfmal gewaschen und mit 5 µg/ml N-terminal biotinyliertem myc-tag-Peptid in PBS für 21 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen der Platten. Die Blockierung der freien Bindungsstellen wurde mit 5% Milchpulver in PBS durchgeführt (1 h, RT). Nach wiederholtem Waschen der Platten wurde das myc-tag-Peptid in Konzentrationen ab 1 mM bzw. 2 mM (in der Messung mit 9E10-R^{H53}G) vorgelegt und in den weiteren Reaktionsgefäßen der Platte in Fünfer-Schritten verdünnt. Die Anfangskonzentration des c-myc(408-427)-Peptides lag bei 0,02 mM (Messung mit 9E10), 0,1 mM (Messung mit G^{H52}S, S^{H100h}Y und F^{L30}I), 1 mM (Messung mit L_{Keimbahn}/H_{9E10}), 1,5 mM (Messung mit L_{9E10}/H_{Keimbahn}) und 6 mM (Messung mit L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}). Anschließend kamen 3 µg/ml 9E10-Fab oder 6-34 µg/ml Rückmutanten auf ein Totalvolumen von 50 µl PBS mit 5% MP für 2 Stunden bei 25°C im Inkubator hinzu. Einem weiteren Waschvorgang, wie er bereits früher durchgeführt wurde, schloss sich dann die Inkubation mit einer 1:500 Verdünnung des anti-Maus-Ig HRP-markierten Antikörpers in 5 % MP/PBS für 1 Stunde bei 25°C im Inkubator an. Die Peroxidase wurde durch Zugabe von 50 µl TMB-Substrat-Lösung aktiviert, und die Kinetik der Reaktion wurde bei A_{620 nm} (450 nm Referenzfilter) am Photometer (Anthos HT2) gemessen. Zum Vergleich erfolgte auch eine Endpunktbestimmung, und zwar wurde dafür zuerst die Peroxidaseaktivität durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt und dann die Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) gemessen.

Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D wurde nach der Formel:

$$\Delta A_{620nm} = (A_{max620nm} * K_D / (Konzentration_{Peptid} + K_D)) + Off$$
errechnet, wobei Off den Wert der Basislinie darstellt.

Der kompetitive ELISA zur Bestimmung des K_D der Bindung der Fab-Fragmente an das 20-mer Peptid wurde mit 100 $\mu\text{g/ml}$ c-myc(408-427)-Peptid beschichtet und mit 1 x *Spots Blocking Buffer* in PBS geblockt. Die eingesetzten Konzentrationen der Fabs betrugen 0,3 $\mu\text{g/ml}$ für 9E10 und 3-50 $\mu\text{g/ml}$ für die Rückmutanten. Weitere Experimente zur Kontrolle der spezifischen Bindung von Fab der kompletten Keimbahnrückmutante des 9E10 an das c-myc(408-427)-Peptid wurden mit einem randomisierten myc-Peptid (LDIKLQERESRKLRLQEEAEL) in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

5.2.4.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten und K_D mittels SPR

An einem Sensorchip an der Biacore 2000 (Uppsala, Schweden) wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) (Jonsson et al., 1991) die Wechselwirkung des 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten) mit den Peptiden myc-tag und c-myc (408-427) in Echtzeit verfolgt. Das myc-tag abgeleitete Peptid CGGEQKLISEEDLN und das Peptid LIEDNEYTARQGA β AC für die Negativkontrolle, sowie das c-myc(408-427) abgeleitete Peptid CAEEQKLISEEDLLRKRREQL und das Peptid TSTEPQYGPGENL β AC für die Negativkontrolle wurden auf der Oberfläche des CM5-Chips (Biacore) über die Thiol-Gruppen der N-terminalen Cysteine nach der Ligand-Thiol-Methode nach Protokoll (Biacore Thiol-Kopplungs-Kit) unter Verwendung des Borat- und Natriumformiat-Puffers immobilisiert. Der Anteil der kovalent an die Chipoberfläche gekoppelten Peptide entsprach je 873, 926, 1213 und 717 Resonanzeinheiten (RU). Die Bindungsexperimente erfolgten bei einer Durchflussrate des HBS-Puffers von 10 $\mu\text{l/min}$ und 1 $\mu\text{l/min}$ (Sättigungsexperiment) bei 23°C. Für die myc-tag-Peptid-Bindungsstudien wurde 9E10-Fab in Konzentrationen von 0,05 bis 0,97 μM (fünf verschiedene Konzentrationen) eingesetzt. Für die rekombinant hergestellten Fab-Fragmente wurden Konzentrationen von 0,06 (dreimal) und 0,04 μM (dreimal) für 9E10, von 0,1 bis 3 μM (fünf verschiedene Konzentrationen) für 9E10 H^{H31}S, von 2 bis 11 μM (acht verschiedene Konzentrationen) für 9E10 R^{H53}G, von 0,1 bis 2,5 μM (fünf verschiedene Konzentrationen) für 9E10 H^{H58}Y und von 0,5 bis 3,6 μM (sechs verschiedene Konzentrationen) für 9E10 T^{L91}S eingesetzt. Die Tests mit dem c-myc(408-427)-Peptid erforderten Fab-Konzentrationen von 0,5 bis 15 nM (sechs verschiedene Konzentrationen) für 9E10 (aus der Proteolyse des IgG) sowie für die rekombinant hergestellten Fabs von 0,1 bis 2,8 μM (sechs verschiedene Konzentrationen) für 9E10 G^{H52}S, von 0,01 bis 1,3 μM (sechs verschiedene Konzentrationen) für 9E10 S^{H100h}Y, von 5 bis 60 nM

(sieben verschiedene Konzentrationen) für 9E10 F^{L30}I, von 0,05 bis 1,5 µM (sechs verschiedene Konzentrationen) für L_{Keimbahn}/H_{9E10}, von 1 bis 3 µM (sechs verschiedene Konzentrationen) für L_{9E10}/H_{Keimbahn} und von 2 bis 7 µM (fünf verschiedene Konzentrationen) für L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}. In den Sättigungsexperimenten an der mit dem myc-tag-Peptid beschichteten Chipoberfläche wurden sechs Konzentrationen von 0,01 bis 4 µM an 9E10-Fab (aus der IgG-Proteolyse) eingesetzt. Das injizierte Volumen lag bei 20 µl bzw. 15 µl (Sättigungsexperiment). Der Sensorchip ließ sich mit 100 nM NaOH im Falle der Bindung der Fabs an das myc-tag-Peptid und mit Glycin-Puffer (pH 1,5) im Falle der Bindung an das c-myc(408-427)-Peptid regenerieren. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} erfolgte mit der Biaevaluation Software. Dafür wurden die Sensorgramme für die Negativkontrolle von der Positivkontrolle subtrahiert. Die kinetischen Konstanten wurden durch globales mathematisches Fitten (simultane Anpassung an mehrere Messungen bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen) der Assoziations- und Dissoziationsbereiche der Kurven errechnet. Aus den kinetischen Konstanten konnte die Konstante K_D berechnet werden ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Aus den Sättigungsexperimenten konnte K_D über eine Abtragung von $1/RU$ gegen $1/[Fab]$ nach Lineweaver und Burk errechnet werden. K_D ergab sich aus dem Anstieg ($m = K_D/RU_{max}$) der linearen Geraden ($1/RU = m * (1/[Fab]) + n$, $n = 1/RU_{max}$).

5.2.5 Modellierung der Bindung des c-myc(410-427)-Peptides an 9E10

Die Bindung des um vier Aminosäuren C-terminal verlängerten myc-Peptides an den 9E10-Antikörper wurde in einem Modell dargestellt. Dieses Modell basiert auf den Daten der Kristallstrukturanalyse des 9E10-Fab im Komplex mit dem myc-tag-Peptid (410-420) (N. Krauß et al., 2007) und der Überlagerung des Peptidrückgrates (C α -Atome 410-420) des myc-tag-Peptides mit entsprechenden C α -Atomen aus den in der PDB-Datenbank verfügbaren Strukturen des humanen c-Myc-Proteins (1NKP, Nair et al., 2003 und 1A93, Lavigne et al., 1998). Mit den Atomkoordinaten aus der Überlagerung wurde in dem Programm „O“ (Jones et al., 1991) eine Peptidbindung zwischen den Resten 420 und 421 geknüpft und eine Energieminimierung durchgeführt (N. Krauß). Mit dem Programm Pymol (www.pymol.org) wurde der Rest N^{P420} zu L mutiert und das nun vollständige Peptid im Komplex mit dem 9E10-Fab nochmals einer abschließenden Energieberechnung im Vakuum mit GROMOS96 43B1 (Gunsteren et al., 1996) im Swisspdbviewer unterzogen

(www.expasy.ch/spdbv). Im Endergebnis zeigt dieses Modell eine mögliche Interaktion des C-Terminus(421-427) des c-myc(410-427)-Peptides an den 9E10.

5.2.6 Standardmethoden

Transformation in XL-1, JM83 und BL21-Gold kompetente Zellen

Die Zellen XL-1, JM83 und BL21-Gold wurden nach einer CaCl_2 -Methode kompetent gemacht. Hierzu wurden die Zellen in 100 ml LB-ls bis zu einer $\text{OD}_{550\text{nm}} = 0,48$ bei 37°C auf dem Schüttler angezogen und durch Zentrifugation ($5000 \times g$, 4°C , 10 min) geerntet. Dann wurde das Zellpellet vorsichtig in 80 ml eiskalter MgCl_2 -Lösung (100 mM) resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine erneute Resuspension in 40 ml 50 mM CaCl_2 -Lösung auf Eis mit einer 30-minütigen Inkubation und anschließenden Zentrifugation. Zum Schluss wurden die Zellen in 4 ml eiskalten 50 mM CaCl_2 -Lösung und 15% Glycerol aufgenommen und in 100 μl Aliquote bei -70°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, und es wurde 0,5 μl des Expressionsvektors pASK85-9E10(x) (100-200 ng/ μl) hinzugegeben und 30 min auf Eis, 5 min im 37°C Wasserbad und wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Die nun transformierten Zellen wurden mit 37°C warmen 1 ml SOC-Medium gemischt und 20 min bei 37°C geschüttelt. 10 μl und 100 μl des Ansatzes wurden abschließend auf LB-Agarselektionsplatten mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

DNA-Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Probe wurde zuerst mit DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in Agarosegelen (0,8 - 2 %) mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid im TBE-Puffer bei 15 V/cm aufgetrennt. Zur Konzentrations- und Größenabschätzung wurden die DNA-Marker 2-Log DNA Ladder oder Smart DNA Ladder bei jeder Auftrennung hinzugefügt.

Proteinauftrennung in der SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden mit Ladepuffer (reduzierend bzw. nicht reduzierend) verdünnt und bei 95°C für 5 min im Thermoblock denaturiert. Die Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammelgel (5% Acrylamid) und einem Trenngel (12 oder 15% Acrylamid), erfolgte bei 2 bzw. 4 mA/cm im Laemmli-Puffer. Die Anfärbung der Proteine im Gel geschah mit Coomassieblau durch eine 30 min Inkubation bei RT in der Coomassie-Färbelösung mit anschließendem Waschen in der Coomassie-Entfärbelösung und Fixierung mit Coomassie-Fixierer. Das Gel konnte abschließend auf Filterpapier im Gelrockner (BioRad) getrocknet werden.

Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine mit Elektrophorese-Blotpuffer benetzte PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) mit Hilfe eines Semi-Dry-Elektroblots (0,8 mA/cm², 15 min) von BioRad transferiert. Das Blocken der freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 5% MP in TTBS für eine Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen (3 x 5 min in TTBS) wurde nach einer Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C der His-tag mit einem anti-His(6) HRP-markierten Antikörper (2 µg/ml in 5% MP/TTBS), die murinen Fab-Antikörperdomänen mit einem anti-Maus-IgG(Fab) HRP-markierten Antikörper (2 µg/ml in 5% MP/TTBS) und die κ-Region der leichten Kette des 9E10 mit einem anti-Maus-IgG-kappa HRP-markierten Antikörper (2 µg/ml in 5% MP/TTBS) nachgewiesen. Entwickelt wurde nach dem Waschen mit präzipitierendem TMB-Substrat von Seramun. Das abschließende Spülen der Membran mit destilliertem Wasser stoppte die Reaktion.

5.2.7 Keimbahngensequenzanalyse mit Datenbanken

Die Identifizierung der höchsthomologen Keimbahngensegmente zu den 9E10 variablen Regionen V_H und V_L war mit den Datenbanken IMGT (www.imgt.cnusc.fr) und NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) möglich. Der Aminosäuresequenzvergleich der 9E10 variablen Regionen V_H und V_L mit den Sequenzen bekannter Antikörper erfolgte mit der R.U.Bi.C-Datenbank (www.rubic.rdg.ac.uk).

5.2.8 Programm für Moleküldarstellungen

Die Darstellung von Molekülstrukturen erfolgte mit dem Programm WebLab ViewerPro 4.2 von Molecular Simulations Inc.

6 Ergebnisse

6.1 Identifizierung der Keimbahngene zu 9E10

Zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz der variablen Regionen des 9E10-Antikörpers wurde RNA aus der 9E10-Antikörper produzierenden Myc1-Hybridomzelllinie präpariert und die 9E10-mRNA in cDNA umgeschrieben. Dazu kamen Maus-spezifische Primer zum Einsatz, die in der Sequenz kodierend für die Signalpeptide und die konstanten Domänen κ bzw. γ 1 der Immunglobuline binden (Griebel, 2005). Die PCR-Produkte wurden abschließend in den Expressionsvektor pASK85, wie von U. Griebel beschrieben, kloniert. Die kompletten variablen Regionen des 9E10 wurden zur Kontrolle sequenziert und erfolgreich auf Funktionalität getestet. PCR-Fehler konnten durch unabhängige Amplifikationen und Sequenzierfehler durch die Sequenzierung beider DNA-Stränge ausgeschlossen werden. Die so erhaltenen 9E10-DNA-Sequenzen unterscheiden sich nur minimal von den von Schiweck et al (1997) publizierten Sequenzen am 3' und 5'-Ende (Griebel, 2005). Die Abweichungen betreffen die Aminosäuren H^{H3} anstelle von D, A^{H107} und S^{H108} anstelle von T sowie G^{L100} anstelle von A. Sie sind auf die von Schiweck et al. verwendeten PCR-Primer zurückzuführen, die in den variablen Regionen des 9E10 binden. Am Beispiel des Restes H^{H3} konnte mit Hilfe der Elektronendichte aus der 9E10-Kristallstrukturanalyse bei 2,7 Å (N. Krauß) ein H anstelle von D bestätigt werden. Um Rückschlüsse aus der Affinitäts- und Spezifitätsänderung auf einzelne Rückmutationen im 9E10 ziehen zu können, war die Charakterisierung der vollständigen Sequenz der variablen Regionen für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung. Im weiteren Verlauf wurde mit den durch Unterstützung von U. Griebel ermittelten Sequenzen gearbeitet.

Zur Identifizierung der während der Affinitätsreifung des 9E10-Antikörpers ausgetauschten Nukleotide in den Genen der V_H - und V_L -Domäne wurden in der Keimbahn der BALB/c Maus V-, (D-) und J-Gensegmente mit höchster sequentieller Übereinstimmung mit dem 9E10 ermittelt.

A.	9E10 VH 3:3.39	(1)	E V ³ H L V E S G G D L V K P G G S L	
		(1)	GAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCT	
			Q	
	9E10 VH 3:3.39	(54)	K L S C A A S G F T F S ³¹ H Y G M S	CDR-H1
		(54)	GAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTCACTATGGCATGTCTT	
			S	
	9E10 VH 3:3.39	(107)	W V R Q T P D K R L E W V A ⁵² T I G S	
		(107)	GGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTTAGTAGT	
			S	
	9E10 VH 3:3.39	(160)	⁵³ R G ⁵⁵ T Y ⁵⁸ T H Y P D S V K G R F T I S	CDR-H2
		(160)	CGTGGTACTTACACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGACGATTACCATCTC	
			G S Y	
	9E10 VH 3:3.39	(213)	R D N ⁷⁴ D K N ⁷⁷ A L Y L Q M N ^{82a} S L K S	
		(213)	CAGAGACAATGACAAGAACGCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTCTG	
			A T S	
	9E10 VH 3:3.39	(266)	E D T A M Y Y C A R ⁹⁵ R S E F Y Y Y G	CDR-H3
		(266)	AAGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAAGAAGTGAATTTTATTACTACGGT	
	DFL16.1 (1)		-----TTTATTACTACGGT	
			H	
	9E10 VH 3:3.39	(319)	^{100c} N ^{100d} T Y Y Y S ^{100h} A M D Y W G Q G A S V T ¹⁰⁷	
		(319)	AATACCTACTATTACTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAGCCTCAGTCAC	
	DFL16.1 J4	(15)	AGTAGCTAC-----	
		(1)	-----ATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC	
			S S Y T	
	9E10 VH 3:3.39	(372)	V S S	
		(372)	CGTCTCCTCA	
	DFL16.1 J4	(44)	-----	
		(44)	CGTCTCCTCA	
B.	9E10 VL 21-2*	(1)	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R	
		(1)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTATCTCTAGGACAGAG	
			GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAG	
	9E10 VL 21-2*	(54)	A T I S C R A S E S V D N Y G F S ³⁰	CDR-L1
		(54)	GGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGGCTTTAGTT	
			I	
	9E10 VL 21-2*	(107)	F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I Y	
		(107)	TTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT	
			TTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT	
	9E10 VL 21-2*	(160)	⁵¹ A I S N R G S ⁵⁴ S G V P A R F S G S G S	CDR-L2
		(160)	GCTATATCCAACCGAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTC	
			A Q	
	9E10 VL 21-2*	(213)	G T D F S L N I H P V ⁷⁸ E E D D P A ⁸³	
		(213)	TGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCATCCTGTAGAGGAGGATGATCCTGCAA	
			M T	
	9E10 VL 21-2*	(266)	M Y F C Q Q T K E V P W T F G G G T ⁹¹	CDR-L3
		(266)	TGTATTTCTGTGCAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACC	
	J1 (1)		-----GTGGACGTTTCGGTGGAGGCACC	
			S	
	9E10 VL 21-2*	(319)	K L E I K	
		(319)	AAGCTGGAAATCAAA	
	J1 (23)		-----	
		(23)	AAGCTGGAAATCAAA	

Abb.6.1. : Sequenzvergleich der 9E10-V-Regionen mit hochhomologen murinen Ig-Keimbahngensegmenten. (A) Vergleich des V_H-Gens mit den Keimbahngensegmenten VH3:3.39, DFL16.1 und JH4 sowie (B.) des V_L-Gens mit 21-2* und J1. Die in den 9E10-Genen (oben) und in den Keimbahngenen (unten) kodierten Aminosäuren sind dargestellt. Die Definition der CDRs erfolgte nach Kabat (1991).

Eine Recherche mit IgBlast aus der NCBI-Datenbank ergab für das 9E10-V_H-Gen die Keimbahngensegmente VH3:3.39 für das V-Gensegment (14 Nukleotidaustausche), DFL16.1 für das D-Gensegment (2 Nukleotidaustausche) und JH4 für das J-Gensegment (2 Nukleotidaustausche) sowie für das V_L-Gen das V-Gensegment 21-2* (10 Nukleotidaustausche) und das J-Gensegment J1 (0 Nukleotidaustausche) (Abb.: 6.1.). Die selben Gensegmente wurden mit Hilfe der IMGT-Datenbank gefunden. Darüber hinaus zeigte ein Homologievergleich mit dem V-Gensegment des 9E10-V_H-Gens und dem Genom der C57BL/6J Maus (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) die höchste Übereinstimmung mit dem Locus NT_039553 auf dem Chromosom 12, das zudem eine 100%-ige Identität zu dem V-Gensegment VH7183.7b aufweist. Nach Langdon et al. (2000) ist das Gensegment VH7183.7b identisch mit VH3:3.39 aus der BALB/c Maus. Die höchste Übereinstimmung mit dem V- und J-Gensegment für das 9E10-V_L-Gen zeigte der Locus NT_039350 auf dem Chromosom 6, wobei die gefundenen Sequenzabschnitte identisch mit 21-2* und J1 sind. Hiernach gibt es keine weiteren V-Gensegmente der V_H-Domäne sowie V-Gensegmente der V_L-Domäne im Mausgenom, die eine höhere Homologie zum 9E10 aufweisen, als die bereits beschriebenen. Schiweck et al. (1997) haben für das 9E10-V_H-Gen ebenfalls postuliert, dass es aus den Gensegmenten DFL16.1, JH4 und einem V-Gensegment aus der 7183 Unterfamilie stammt.

Der Keimbahngen-kodierte 9E10 setzt sich also höchstwahrscheinlich aus den Gensegmenten VH3:3.39, DFL16.1 und JH4 für das V_H-Gen sowie 21-2* und J1 für das V_L-Gen zusammen. Eine eindeutige Aussage zu Hypermutationen im V_H-Gen am Rekombinationsort zwischen den Segmenten V und D kann aufgrund einer Exonukleaseaktivität und des zufälligen Einbaus von N-Nukleotiden durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) nicht getroffen werden. Solche Regionen können sehr unterschiedlich sein, so dass sie eindeutige Marker für einen B-Zell-Klon darstellen. Die Base Thymin an der Verknüpfungsstelle zwischen den D- und J-Gensegmenten könnte dagegen ein potentiell P-Nukleotid sein, das bereits mit großer Wahrscheinlichkeit im nicht hypermutierten V_H-Gen von 9E10 auftritt. In dieser Arbeit werden die V-Domänen des 9E10 auf die Sequenz der Keimbahngensegmente, aus denen er

höchstwahrscheinlich hervorgegangen ist, zurückmutiert und im Weiteren als $H_{\text{Keimbahn}}/L_{\text{Keimbahn}}$ bezeichnet. Die P- und N-Nukleotide am V-D-Rekombinationsort werden aufgrund der fehlenden Sequenzinformation nicht verändert, womit das Konstrukt $H_{\text{Keimbahn}}/L_{\text{Keimbahn}}$ ein potentieller Vorläufer des 9E10 sein könnte. Die Abb. 6.1. zeigt die Verteilung der somatischen Mutationen in den CDRs und FRs in den Genen von V_H und V_L . Die Lokalisierung der Mutationen im Protein wird im folgenden Kapitel und in der Abb. 6.3. beschrieben.

Im kodierenden Strang werden die Purine mit insgesamt 6 bzw. 4 Mutationen für Adenin und 8 bzw. 5 Mutationen für Guanin in der V_H - und V_L -Region häufiger mutiert (Tabelle 6.2.). Das häufige Auftreten von Purinmutationen in der somatischen Hypermutation wird für murine und humane variable Regionen (Mistein und Neuberger, 1996) als auch für V_{HH} -Regionen aus Kamelen (De Genst et al., 2004) beschrieben. Die Transition, d.h. der Ersatz eines Purins oder Pyrimidins durch ein anderes Purin oder Pyrimidin, ist die häufigste Form des Basenaustausches in den 9E10-V-Regionen (17 von insgesamt 27). Mit Ausnahme der FR-Mutationen $A^{H74}D$, $A^{H77}T$ und der CDR-L2-Mutation $A^{L51}I$ resultieren alle somatischen, zu einem Aminosäureaustausch geführten Mutationen im 9E10 aus *hot spot*-Sequenzen mit den Motiven RGYW, TW und WA (Rogozin et al., 2001).

Tabelle 6.2.: **Mutationshäufigkeit der Purine und Pyrimidine in den V-Regionen des 9E10.**

V_H					V_L			
	A	C	G	T	A	C	G	T
A	/	2	4	0	/	1	2	1
C	2	/	0	0	0	/	0	1
G	5	3	/	0	4	1	/	0
T	0	1	0	/	0	0	0	/

Ein Sequenzvergleich der 9E10 variablen Regionen mit bekannten Antikörpersequenzen in der R.U.Bi.C.-Datenbank zeigt folgende ungewöhnliche Sequenzmerkmale. So befindet sich an Position 83 in der FR-L3 ein Prolin. Prolin, das ein Threonin substituiert, kommt an der Position 83 mit einer Häufigkeit von 0,096 % in den bekannten murinen Antikörpersequenzen vor. Selten ist ebenfalls der Lysinrest 106a (0,542 %) in der FR-L4-Region. Der durch die somatische Mutation von Serin entstandene Histidinrest 31 (0,652 %) in der CDR-H1 und der Methioninrest 100j (0,150 %) in der CDR-H3 sind ebenfalls ungewöhnlich selten an diesen Positionen.

6.2 Verteilung der somatischen Mutationen im 9E10 und Auswahl der Einzelmückmutanten

Die somatischen Mutationen im 9E10 verteilen sich über die variablen Domänen (Abb. 6.1. und 6.3.), konzentrieren sich jedoch in den CDRs, speziell in der CDR-H2 und CDR-H3 mit jeweils vier Mutationen (Abb. 6.1.). Auch in den von der Antigenbindungsstelle entfernt liegenden Regionen treten Mutationen auf. Nur drei (H^{H31} , R^{H53} und T^{H100d}) der zwanzig mutierten Reste sind im direkten Kontakt zum myc-tag-Peptid (Abstand $< 4\text{\AA}$).

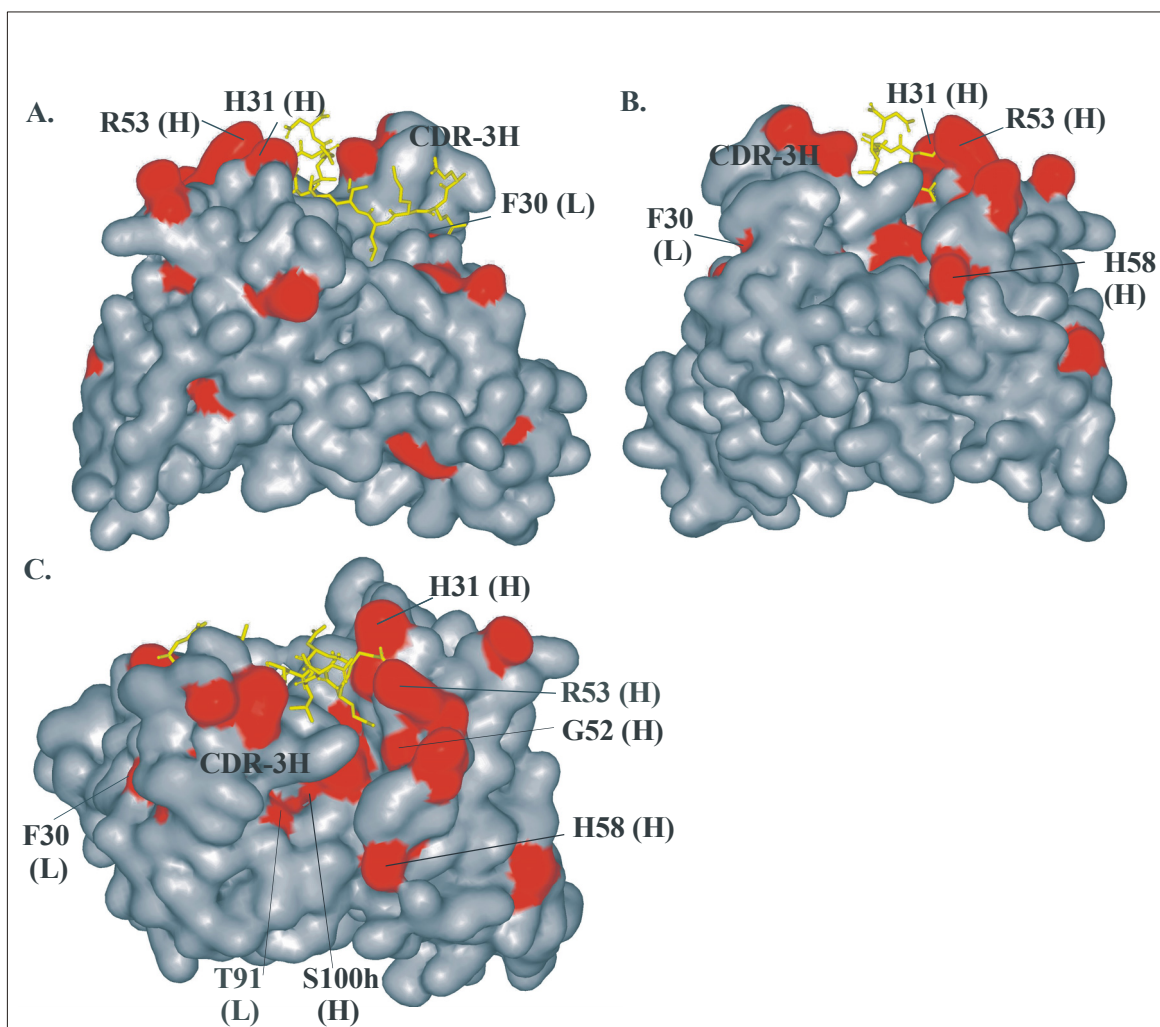


Abb. 6.3. : Lösungsmittel zugängliche Oberfläche der 9E10 variablen Domänen (grau) mit den somatischen Mutationen (rot). Das myc-tag-Peptid ist in Gelb gezeigt. Bei den beschrifteten Resten handelt es sich um die für die Einzelmückmutanten ausgewählten Positionen. (A.) Vorderansicht, (B.) Rückansicht und (C.) Draufsicht auf den 9E10-myc-Peptid-Komplex.

Für die in der Aufgabenstellung definierte Frage nach dem Einfluss der Rückmutanten auf die Affinität und Spezifität des Antikörpers sollten Einzelrückmutationen untersucht werden. Im Hinblick auf die hohe Anzahl der somatischen Mutationen (20) wurden nur einige Mutationen hierfür ausgewählt. Neben den in der Zielstellung benannten Einzelrückmutationen H^{H31}S, G^{H52}S, R^{H53}G und H^{H58}Y wurden zusätzliche Einzelrückmutationen mit Hilfe der Daten aus der Kristallstrukturanalyse nach der folgenden Frage ausgewählt. Welchen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des 9E10 haben die lange CDR-H3 und die sie an der Schleife bzw. an der Basis kontaktierenden CDR-L1 und CDR-L3? In der CDR-L1 und CDR-L3 tritt jeweils eine somatische Mutation auf, nämlich I^{L30}F und S^{L91}T. Die Einzelrückmutation F^{L30}I soll die Rolle dieser längeren CDR-L1 klären. Die Einzelrückmutationen T^{L91}S in direkter Nachbarschaft zu S^{H100h}Y nahe der Basis der CDR-H3 sind für die Analyse der CDR-H3-Basisregion gewählt worden. In der Abbildung 6.3. sind die zu analysierenden Positionen dargestellt.

6.3 Epitopverlängerung und Modellierung der Bindung an 9E10

Um geringe Änderungen in der Affinität und Spezifität der Keimbahnrückmutanten zu analysieren, wurden Bindungsexperimente mit myc-Peptiden unterschiedlicher Affinitäten durchgeführt. Wie in der Zielstellung formuliert, wurde das kürzeste vom 9E10 gebundene Peptid KLISEEDL und das als myc-tag bezeichnete Peptid EQKLISEEDLN ausgewählt (Hilpert et al. 2001, Munro und Pelham, 1986), um die Bindung zu den Rückmutanten zu testen. Das Fab der Keimbahnrückmutante L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} zeigt jedoch keine nachweisbare Bindung an diese Peptide, weder im ELISA noch in Peptidspot-Analysen. Eine Lösung des Problems boten hierfür die Daten aus der Kristallstrukturanalyse des 9E10-Fab im Komplex mit dem myc-tag-Peptid. Die Kristallstruktur, bei einer Auflösung von 2,7 Å, zeigt den N-Terminus des myc-tag-Peptides in einer dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur mit der langen CDR-H3 der V_H-Domäne. Der C-Terminus bildet eine kurze α -Helix in der Nähe der CDR-H3 (Krauß et al., 2007). Die Konformation des myc-tag-Peptides bei der Bindung an das 9E10-Fab in der Kristallstruktur wurde mit der Konformation der C α -Atome der Aminosäuren 410-420 des humanen c-Myc-Proteins aus einer Kristall- und einer ¹H-NMR-Struktur (Komplex mit Max-Protein Nair et al., 2003, Lavigne et al., 1998) verglichen. Im c-Myc-Protein bilden diese Aminosäuren eine α -Helix. Die Überlagerung dieser C α -Atome

brachte eine exakte Übereinstimmung der Konformation des Peptidrückgrates im Bereich 415-419 (mit einer leichten Abweichungen in der Position 420 des myc-tag-Peptides) aller drei Moleküle (Abb. 6.4.A).

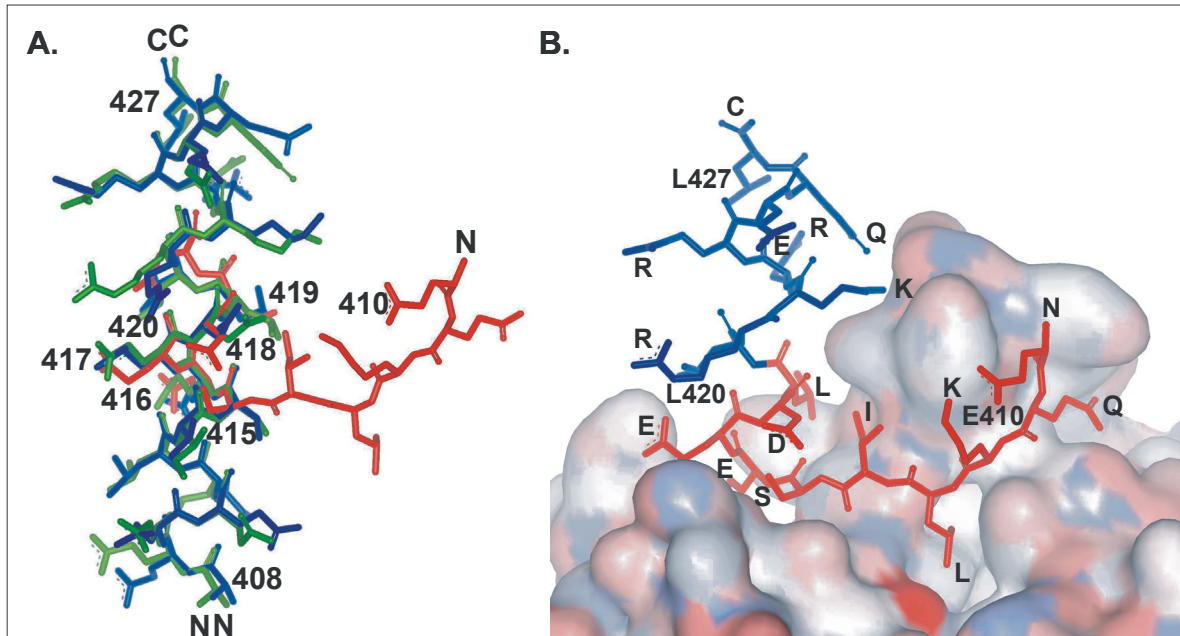


Abb. 6.4. : **Modell der Bindung eines C-terminal verlängerten myc-Peptides.** (A) Die C α -Atom-Überlagerung des myc-tag-Peptides (410-420), entnommen der Komplexstruktur mit 9E10-Fab (rot), mit der Myc- α -Helix (408-427), aus einer Kristallstruktur (grün, 1NKP) und einer ^1H -NMR-Struktur (blau, 1A93), zeigt für alle Moleküle eine gleiche α -helikale Konformation der Reste 415-420. (B) Modell einer möglichen Bindungskonformation eines C-terminal verlängerten myc-Peptides (410-427) (blau) in der Bindungstasche des 9E10 (Oberflächendarstellung). Die Konformation der Reste 410-419 (rot) entspricht der des myc-tag Peptides in der Komplexkristallstruktur.

Da Evan et al. (1985) die Maus, aus der der 9E10-Antikörper gewonnen werden konnte, mit einem 32 Aminosäure langem c-myc-Peptid (408-439) immunisierten, wurden am C-Terminus der kurzen α -Helix des myc-tag-Peptides zusätzlich sieben Aminosäuren als α -Helix in die Kristallstruktur modelliert (Abb. 6.4. B). Laut diesem Modell befindet sich der verlängerte α -helikale C-Terminus des Peptides in direkter Nachbarschaft zur CDR-H3. Wechselwirkungen der CDR-H3 mit den ihr zugewandten Seitenresten des Peptides wären nicht auszuschließen. Unter der Annahme weiterer Kontakte des myc-Peptides zum 9E10 wurde das in der Literatur beschriebene Epitop E⁴¹⁰QKLISEEDL⁴¹⁹ nicht nur am C- sondern

auch am N-Terminus verlängert und das neue Peptid A⁴⁰⁸EEQKLISEEDLLRKRREQL⁴²⁷ in Bindungsexperimenten getestet.

Das 9E10-Fab und die Fabs der Keimbahnrückmutanten wurden somit in ihrer Bindung zu einem 8-, 11- und einem 20-mer myc-Peptid untersucht.

6.4 Mutagenesestudien an 9E10 und bakterielle Fab-Expression in *E. coli*

Mutagenesestudien

Die Rückmutation der 9E10-V-Regionen auf die Sequenz der Gensegmente VH3.3:39, DFL16.1, JH4 sowie VL21-2* und J1 wurde mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese mittels PCR durchgeführt.

Die Arbeiten von Schiweck (Schiweck et al., 1997) haben gezeigt, dass eine funktionelle periplasmatische Expression von 9E10-Fab in *E. coli* mit Hilfe des Expressionsvektors pASK85 möglich ist. In dieser Arbeit sollten die 9E10-Rückmutanten als Fab in *E. coli* synthetisiert werden. Auch hier diente pASK85 als Expressionsvektor, kodierend unter anderem für die konstanten murinen Immunglobulinregionen C_L und C_{H1} der Klasse κ und γ1, die Signalpeptidsequenzen *OmpA* und *PhoA* und den C-terminalen His(6)-tag an der C_{H1}-Domäne. Die Immunglobulinklasse der konstanten Domänen im 9E10-Fab bleibt somit für die Expression in *E. coli* unverändert (siehe dazu Evan et al., 1985). Die Expression von Fab hat zudem den Vorteil, dass der Winkel zwischen der V_H- und V_L-Domäne des 9E10 nicht geändert wird, im Gegensatz zum scFv, das hier eine höhere Flexibilität aufweisen kann. Die Fusion des His-tag mit der schweren Kette hat zudem den Vorteil, dass bei einer Reinigung des Fab über den His-tag Leichtketten-Homodimere nicht angereichert werden können. Im Gegensatz zu Leichtketten-Homodimeren sind Schwereketten-Homodimere sehr selten, so dass ihre Ausbildung hier weniger zu erwarten wäre. Es wird ebenfalls als wenig wahrscheinlich angesehen, dass sich einzelne, lösliche schwere Ketten (V_H-C_{H1}) bilden. Als Ausgangskonstrukt für die Rückmutationen in den 9E10 variablen Regionen wurde der pASK85-9E10 mit den 9E10 variablen Regionen aus der Hybridomzelllinie Myc1 (Griebel, 2005) verwendet.

Die Einführung sowohl von Einzel- als auch Mehrfachmutationen in den Genen des 9E10 erfolgte mit Hilfe von Primern. Genabschnitte, ganze Gene oder der gesamte pASK85-9E10-Vektor wurden mit mutierten Primern amplifiziert, wobei die Amplifikation kurzer Genabschnitte bevorzugt angewendet wurde, um PCR bedingte Mutationen im Vektor zu vermeiden. Mit dem Einsatz von Primern konnten eine oder mehrere Mutationen gleichzeitig in ein amplifiziertes PCR-Produkt eingeführt werden. Eine Markierung der Primer mit Restriktionsschnittorten machte eine anschließende schnelle Identifizierung der mutierten Gene möglich. In Abhängigkeit von der Lage der zu mutierenden Positionen im Gen und der Entfernung zu potentiellen Klonierungsschnittstellen wurden verschiedene Strategien angewandt. So wurden die Einzelmutationen H^{H31}S, G^{H52}S und auch die Mehrfachmutationen über die Amplifikation einzelner Genabschnitte aus dem pASK85-9E10 mit anschließender Assemblierung der PCR-Produkte für die Klonierung über Restriktionsschnittorte in den Vektor (Abb. 6.5.) und Ligation in den Vektor hergestellt. Die Synthese der Einzelmутanten 9E10 R^{H53}G und H^{H58}Y erfolgte mit den von U. Griebel zur Verfügung gestellten Primern in mehreren aufeinander folgenden PCR-Reaktionen, die der Einzelmутanten 9E10 S^{H100h}Y, F^{L30}I und T^{L91}S dagegen in einer einzigen PCR-Reaktion.

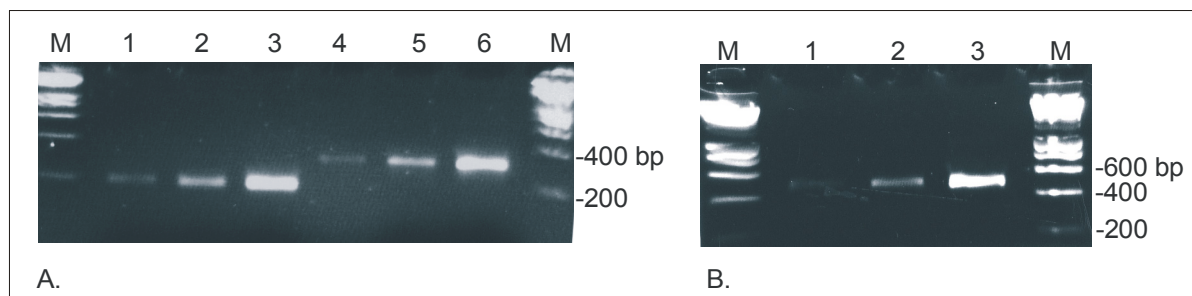


Abb. 6.5. : **Gentechnische Herstellung einer Rückmutante am Beispiel von 9E10 H^{H31}S.** Dargestellt sind Ethidiumbromid-angefärbte Agarosegele (2%) der (A.) gereinigten, aus dem pASK85-9E10 amplifizierten DNA-Fragmente 207 bp (1-3) und 315 bp (4-6) und (B.) des Assemblierungsproduktes (479 bp) aus der Synthese des Konstruktes pASK85-9E10(H^{H31}S). Die abgeschätzte DNA-Menge pro Bande beträgt ca. je 5; 15 und 50 ng. M entspricht dem Marker Smart DNA Ladder.

Die so entstandenen, Keimbahn-rückmutierten 9E10-Gene im pASK85 wurden in die stabile *E. coli*-XL-1-Zelllinie, die geringe genetische Veränderungen aufweist, transformiert und anschließend selektiert. Die mutierten 9E10-Varianten im pASK85-Vektor konnten über einen

für jede Mutation spezifischen Restriktionsverdau identifiziert werden. Die Zellen, die die mutierten pASK85-9E10(x) Konstrukte enthielten, wurden im analytischen Maßstab kultiviert und auf periplasmatische Expression von Fab untersucht. Nach dem Periplasmaaufschluss der Zellen wurden sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot untersucht. Vektoren erfolgreich exprimierender Zellklone wurden zur Kontrollsequenzierung der mutierten variablen Regionen verwendet.

Fab-Expression

Das lösliche periplasmatische Fab-Expressionsmuster ist für alle 9E10-Rückmutanten, bis auf 9E10 H^{H31}S, gleich (Abb. 6.6.A.). Die Abbildung 6.6.A. zeigt das Expressionsmuster von 9E10-Fab und von der Rückmutante 9E10 H^{H31}S, die bei 37°C kultivierten Zellkulturen entstammen. Dargestellt wird das Expressionsmuster von jeweils zwei unabhängigen, Fab exprimierenden Klonen der *E. coli*-JM83-Zelllinie. Zu erwarten wären im Western-Blot nach einer Proteinauftrennung in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE, eine im Idealfall einzelne Proteinbande mit einer Molekularmasse von ca. 50 kD, die das Fab repräsentiert und in der sowohl die V_H-C_{H1}-His-tag- als auch die V_L-C_L-Kette mit den jeweiligen spezifischen Nachweisantikörpern nachweisbar sind. Nicht assemblierte einzelne Ketten sollten mit einer Molekularmasse von 26 kD für V_H-C_{H1}-His-tag bzw. 24 kD für V_L-C_L auftreten. In den Western-Blots sind dagegen neben den Fab-Fragmenten einzelne Ketten und möglicherweise auch Leichtketten-Homodimere detektierbar. Die Abbildung zeigt, dass in der Negativkontrolle mit den Zellen (JM83), die nicht mit dem Expressionsvektor transformiert wurden, keine Bindungsreaktion der Nachweisantikörper anti-kappa und anti-His(6) mit zelleigenen Proteinen zustande kommt. Bei den löslichen periplasmatischen Proben, die aus den 9E10-Fab exprimierenden Klonen stammen, werden mit dem anti-His-Antikörper eine Proteinbande mit einer Molekularmasse von ca. 46 kD (Fab) und eine mit ca. 30 kD (V_H-C_{H1}-His-tag) beobachtet. Mit dem anti-kappa-Antikörper werden eine Doppelbande mit einer Molekularmasse von ca. 46 kD und eine Bande bei ca. 21,5 kD (V_L-C_L) nachgewiesen. Bei der Bande mit der höheren Molekularmasse (obere Bande) in der 46 kD-Doppelbande handelt es sich um ein mit dem His-tag fusioniertes Fab.

Die Rückmutation H^{H31}S im 9E10 bewirkt eine höhere Fab-Ausbeute, was sich im Verhältnis der beiden Doppelbanden untereinander widerspiegelt (Abb. 6.6.A.). Im Western-Blot erscheint die Proteinbande mit der höheren Molekularmasse (Fab) intensiver als die mit der geringeren (untere Bande). Bei der Bande mit der geringeren Molekularmasse (untere Bande)

in der 46-kD-Doppelbande könnte es sich um Leichtketten-Homodimere mit einer errechneten Molekularmasse von ca. 48 kD handeln, da hier ausschließlich leichte Ketten nachgewiesen werden konnten.

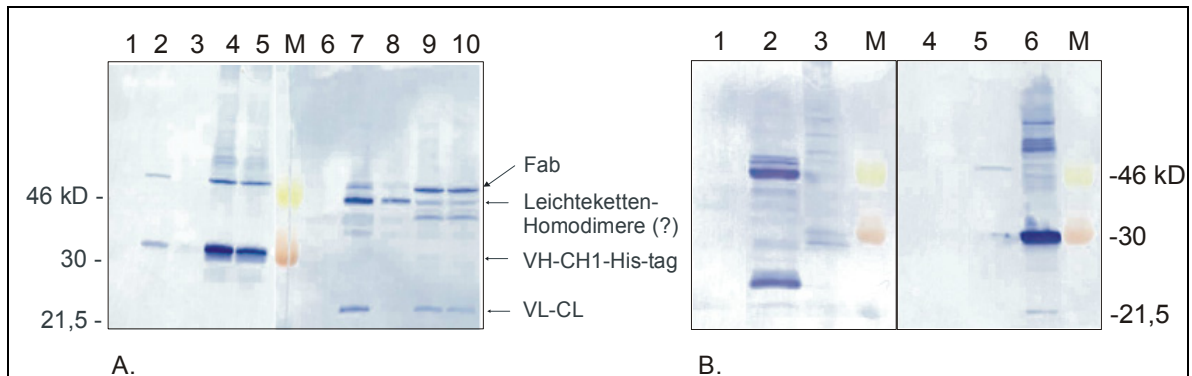


Abb. 6.6. : **Western-Blots der bakteriellen Produktion von Fab. Die Proben wurden zuvor in 12% nicht reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt.** (A.) Fab-Expressionsmuster zweier Klone von 9E10 (2, 3, 7 und 8) und der Rückmutante H^{H31}S (4, 5, 9 und 10) in JM83-Zellen (8 µl von 100 µl PP). Die Bahnen 1 und 6 entsprechen der löslichen periplasmatischen Fraktion von nicht mit dem Expressionsvektor transformierter Zellen (8 µl von 1:100 Konzentrierung der ZK). In den Bahnen 1-5 erfolgte der Nachweis der schweren Kette und in den Bahnen 6-10 der der leichten Kette, wie unter (B.) beschrieben wird. (B.) Nachweis der murinen leichten Kette (1-3) mit anti-kappa-Ig-HRP und der schweren Kette über den His-tag (4-6) mit (anti-His(6)-Ig-HRP) in der unlöslichen (je 1 µl von 1:100 Konzentrierung der ZK (1, 3, 4 und 6)) periplasmatischen Fraktion inklusive der Sphäroplasten der zur 9E10-Expression nicht induzierten (1 und 4) und induzierten (3 und 6) XL-1-Zellen. Zum Vergleich dient das lösliche Periplasma induzierter Zellen (je 18 µl von 1:100 Konzentrierung der ZK (2 und 5)). M entspricht dem Molekulargewichtsmarker.

Die Western-Blot-Analysen in der Abb.6.6.B zeigen zum Vergleich den Anteil der schweren (V_H-C_{H1}-His-tag) und leichten Kette (V_L-C_L) des 9E10 in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Periplasmaaufschlusses. Untersucht wurde dies in der *E. coli*-XL-1-Zelllinie. Zur Kontrolle wurden mit dem pASK85-9E10 transformierte XL-1-Zellen verwendet, jedoch wurde die Expression der Gene der Fab-Fragmente nicht induziert. In der unlöslichen Fraktion des Periplasmaaufschlusses der nicht induzierten *E. coli*-Zellen war kein Protein mit dem anti-His- und dem anti-kappa-Antikörper nachzuweisen. Zur Aggregation neigende, periplasmatisch exprimierte Proteine sind in der unlöslichen Fraktion des Periplasmaaufschlusses des exprimierenden Klons nachgewiesen worden, sie bilden

Einschlusskörper. Der überwiegende Teil der mit dem anti-His-Antikörper detektierten schweren Kette V_H - C_H1 -His-tag ist in der unlöslichen Fraktion des Aufschlusses in Höhe der 30 kD-Markerbande detektierbar. Die leichte Kette V_L - C_L , die vom anti-kappa-Antikörper erkannt wird, akkumuliert hingegen vorrangig in der löslichen Fraktion. Die zum Fab assemblierten Ketten werden lediglich als schwache Bande im Western-Blot in der löslichen Fraktion bei 46 kD sichtbar. Diese Bande wird von beiden Antikörpern, dem anti-His und anti-kappa gebunden. Das Expressionsmuster der Fab-Fragmente ist unabhängig von den getesteten Zellstämmen XL-1, dem schnell wachsenden JM83 (Abb. 6.6.A) und dem Protease (*OmpT*, *Lon*)-defizienten BL21-Stamm (Daten nicht gezeigt).

Fab-Expression im präparativen Maßstab

Die Synthese der Fab-Fragmente in den *E. coli*-XL-1-Zellen erfolgte für den präparativen Maßstab in vier Litern Flüssigkultur aus den zuvor bei einer niedrigeren Temperatur (22°C) angezogenen Zellen. Die Induktion der periplasmatischen Expression unter der Kontrolle des tet-Promotors/Operators erfolgte mit Anhydrotetracyclin und dauerte 2,5 Stunden wie von Schiweck beschrieben (1997). Die löslichen Bestandteile des Periplasmas wurden nach einem Aufschluss nach Skerra (1994) freigesetzt und anschließend dialysiert und gereinigt.

In vitro Fab-Rückfaltung

Da ein großer Teil der schweren Kette in der unlöslichen Fraktion des periplasmatischen Aufschlusses (Abb. 6.6.B.) vorgefunden wurde, lag die Vermutung nahe, dass die schweren Ketten bevorzugt als *inclusion bodies* (Einschlusskörper) in den Zellen abgelegt werden. Aufgrund des höheren Proteinbedarfs für die Charakterisierung der schwächer affinen Konstrukte $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ und $L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}$ wurden jene mittels Rückfaltung gewonnen. Zum Vergleich der Bindungsspezifität zwischen den periplasmatisch und den *in vitro* gefalteten Fabs wurde $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ ebenfalls rückgefaltet und die Bindungsspezifität der beiden Konstrukte verglichen. Hierfür wurden die Zellen nach der Expression komplett aufgeschlossen. Der lösliche Bestandteil (leichte Kette) dieses Aufschlusses als auch die gereinigten *inclusion bodies* (schwere Kette) wurden in Guanidinhydrochlorid unter reduzierenden Bedingungen denaturiert, anschließend langsam bei 10°C gegen das Redoxpaar GSH/GSSG in einer Dialyse renaturiert und wie im Kapitel 6.5. beschrieben gereinigt.

6.5 Reinigung der Fab-Fragmente

Die mit einem His(6)-Tag fusionierten Fab-Fragmente konnten in einer Affinitätschromatographie mit immobilisierten Co^{2+} -Ionen in einem Schritt gereinigt werden, verbunden mit anschließender Einengung der Proben durch Filtration (30 kD MWCO). Die Abbildungen 6.7. und 6.8. zeigen das Elutionsprofil der Reinigung sowie einen Western-Blot und ein SDS-PAG der gereinigten Fab-Fragmente.

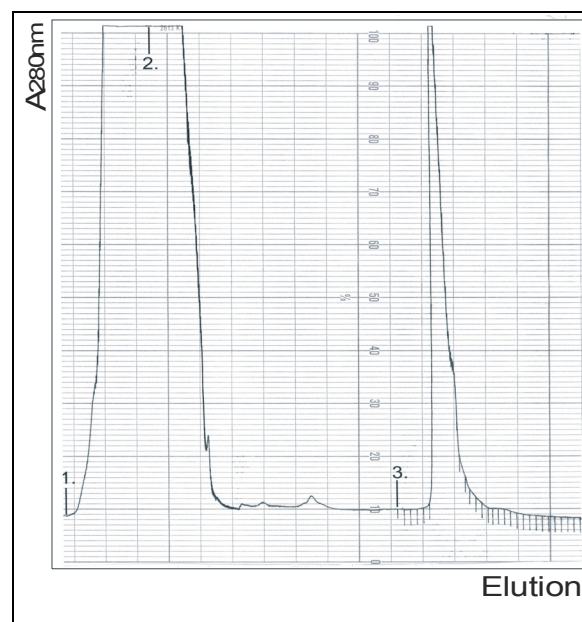


Abb. 6.7. : **Elutionsprofil der chromatographischen Reinigung von periplasmatisch löslichem Fab 9E10 H^{H31}S über den His-tag, detektiert über Absorption bei 280 nm (Bereich: 0,2 AU).** (1.) Auftragen des dialysierten löslichen Periplasmas auf die Säule, (2.) Waschen der Säule und (3.) Eution.

Das Elutionsprofil der Reinigung mit Co^{2+} -Sephrose verdeutlicht die Anreicherung von His-tag fusionierten rekombinanten Proteinen (Abb. 6.7.). Der Erfolg dieser Reinigung konnte in der SDS-PAGE und im Western-Blot belegt werden. Im Western-Blot, dargestellt in der Abb. 6.8., lässt sich die Trennung der oberen Bande der Doppelbande bei 46 kD während der Reinigung verfolgen. Diese Bande wird angereichert und in weiteren Experimenten dieser Arbeit als funktionelles Fab charakterisiert. Jede Fab-Rückmutante wurde in separaten

Chromatographiesäulen gereinigt, um Kontaminationen mit besser exprimierenden Konstrukten, wie dem 9E10 H^{H31}S, zu vermeiden.

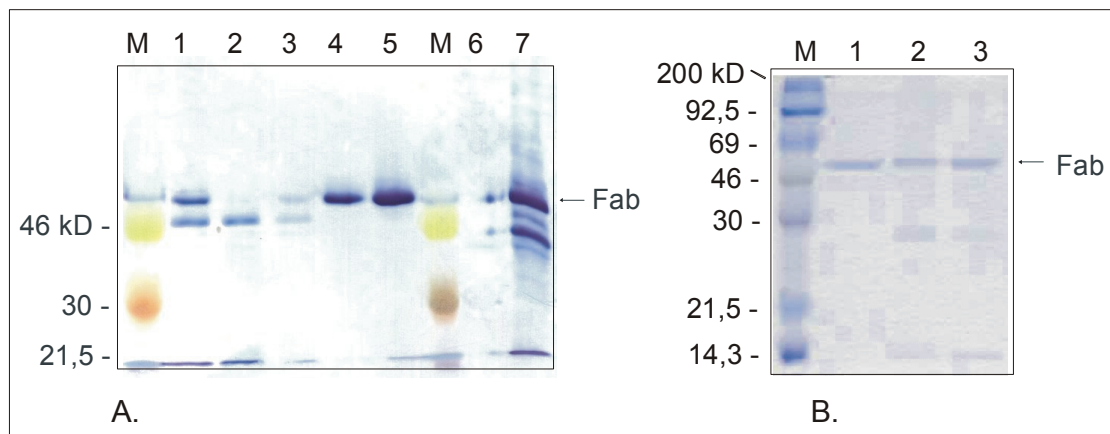


Abb. 6.8. : **Western-Blot und SDS-PAGE der 9E10-Fab-Reinigung.** (A.) Western-Blot der 9E10-Fab-Reinigung aus XL-1-Zellen. Die Proben wurden in 12% nicht reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt. Dargestellt sind die lösliche periplasmatische Fraktion (8 µl von ca. 60 ml (1)), der Durchlauf der Säule (8 µl von ca. 60 ml (2)), das Waschen der Säule (8 µl von 30 ml (3)), das Eluat (8 µl von 5 ml (4)) und das eingeeengte Eluat (0,1 µg (5)). Die Bahn 6. repräsentiert das lösliche Periplasma von nicht transformierten Zellen. Die Bahn 7. enthält die Positivkontrolle aus einem nicht gereinigten 9E10 H^{H31}S-Fab. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen das murine IgG. (B.) 15% nicht reduzierende SDS-PAGE der gereinigten Fab-Fragmente 9E10 H^{H31}S (2) und H^{H58}Y (3) sowie zum Vergleich von 9E10-Fab (1), gewonnen aus einer proteolytischen Abspaltung des Ig (Ch. Scholz), mit je 1 µg Protein. M entspricht dem Molekulargewichtsmarker.

Die Abbildung 6.9. zeigt einen Western-Blot eines rückgefalteten und gereinigten L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} Fab-Konstruktes. Unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird im Western-Blot die 46 kD-Bande mit dem anti-His(6)-Antikörper nicht mehr nachweisbar, stattdessen erscheint eine neue Bande bei 30 kD (Abb. 6.9.). Diese Analyse zeigt, dass das angereicherte Protein das V_H-C_H1-Fragment der schweren Kette enthält, ein Molekulargewicht um 46 kD hat (was dem von Fab-Fragmenten, ca. 50 kD, entspricht) und unter reduzierenden Bedingungen zerfällt. Die Bande im reduzierenden Lauf der SDS-PAGE in Höhe von 30 kD entspricht in etwa dem Molekulargewicht einer einzelnen schweren Kette (ca. 25 kD). Im nicht reduzierenden Lauf der SDS-PAGE sind auch einzelne lösliche schwere Ketten nachweisbar.

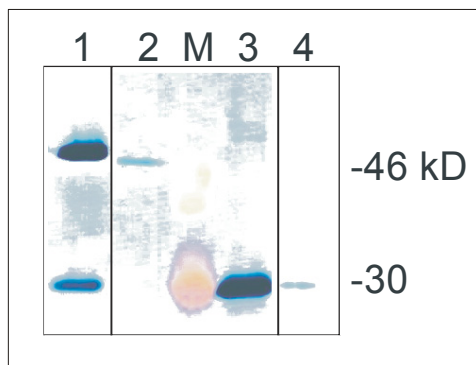


Abb. 6.9. : **Western-Blot von rückgefalteten und gereinigten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ Fab (1,5 μg).** Die Proben wurden in 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Bahn 1 zeigt die schwere Kette im Fab (ca. 46 kD) und als einzelne Kette (ca. 30 kD), nachgewiesen über den His-tag im nicht reduzierenden Lauf, Bahn 3 – die einzelne schwere Kette im reduzierenden Lauf. Gleiches gilt für die Fab-Kontrolle in Bahn 2 und 4. M entspricht dem Molekulargewichtsmarker.

Bei dem hier angereicherten Protein handelt es sich um Fab-Fragmente mit nachgewiesener leichter und schwerer Kette. Allerdings wird die mit dem His-tag versehene einzelne schwere Kette in der Affinitätschromatographie nicht von den Fab-Fragmenten getrennt, was in den Abbildungen 6.8.B. und 6.9. zu erkennen ist.

Die Proteinausbeute nach der Reinigung des löslichen periplasmatisch gefalteten 9E10-Fab mit der Rückmutation $H^{\text{H31}}S$ über Affinitätschromatographie betrug ca. 60 μg pro 1,4 l Zellkultur. Die Ausbeute der übrigen Fab-Konstrukte, die an den selbsthergestellten Säulen gereinigt wurden, lag im Mittel bei 20-100 μg pro 4 l Zellkultur, wenn nur das lösliche periplasmatische Material verwendet wurde. Mit *in vitro* Rückfaltungen aus Einschlusskörpern konnten die Ausbeuten auf 0,6 bis 1,4 mg pro 1 l Zellkultur für die Konstrukte $H_{\text{Keimbahn}}/L_{9\text{E10}}$, $H_{\text{Keimbahn}}/L_{\text{Keimbahn}}$ und $H_{9\text{E10}}/L_{\text{Keimbahn}}$ gesteigert werden.

6.6 Biochemische Charakterisierung von 9E10-Fab und Keimbahnrückmutanten

Die Auswirkungen der somatischen Hypermutationen in den variablen Domänen des 9E10-Fab-Fragmentes auf die Affinität und Spezifität zu seinem Antigen konnten anhand von sieben Einzel-, zwei Kombinationsrückmutanten und einer Kompletrückmutante untersucht

werden. Mit den kombinierten Rückmutanten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ und $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ wurde der Beitrag der einzelnen Domänen zur Reifung des Antikörpers studiert.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und die Kinetik der Bindung der Keimbahnrückmutanten an die Peptide 11-mer myc-tag und 20-mer c-myc(408-427) wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA nach Friguet (1985) und der Methode der Oberflächenplasmonresonanz an der Biacore bestimmt.

Die Untersuchungen zur Bindungsspezifität des Antikörpers erfolgten durch Bindungsanalysen mit myc-Peptiden, hergestellt durch Spotsynthese. Hierfür wurden Substitutionsanalysen an dem humanen 8-mer c-myc(412-420)-, 11-mer myc-tag- 18-mer c-myc(410-427), 20-mer c-myc(408-427)- und an einem substituierten 20-mer c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid durchgeführt. Ergänzende Informationen dazu lieferten Längenanalysen am humanen c-myc-Peptid und Kreuzreaktivitätsanalysen mit homologen myc-Peptiden.

6.6.1 Charakterisierung der Bindungskonstanten an c-myc-Peptide

6.6.1.1 Bestimmung von K_D im ELISA

Der Nachweis der Bindung des 9E10-Fab und seiner Keimbahnrückmutanten an das myc-tag (EQKLISEEDLN) und c-myc(408-427)-Peptid (AEEQKLISEEDLLRKREQL) und die Charakterisierung des Gleichgewichts der Wechselwirkung durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D erfolgte mit Hilfe des enzymgekoppelten Verdrängungs-Immunoabsorptionstests nach Friguet et al. (1985). Dieser Test basiert auf Verdrängung der Bindung der Fab an die an der festen Phase immobilisierten myc-Peptide durch unterschiedliche Konzentrationen an frei löslichen Peptiden. Die Detektion der Bindung der Fabs an die immobilisierten myc-Peptide erfolgt über die Aktivität einer Peroxidase, die an einen Nachweisantikörper gegen konstante murine Fab-Domänen gekoppelt ist. Der K_D ergibt sich aus der Konzentration an frei löslichem Peptid, bei der das Bindungssignal um die Hälfte abnimmt.

Aus der Gleichgewichtskonstanten K_D wurde die freie Standardenergie ΔG° für jede Reaktion nach $\Delta G^\circ = RT \ln K_D$ (Gaskonstante $R = 8,3145 \times 10^{-3} \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T_{\text{ELISA}} = 298,15 \text{ K}$

(25°C)) abgeleitet. Die Änderungen im ΔG° für die Bindung der Keimbahnrückmutanten an das myc-tag-Peptid wurden nach:

$\Delta(\Delta G^\circ)_{9E10\text{-Rückmutante} - 9E10} = RT (\ln K_D 9E10\text{-Rückmutante} - \ln K_D 9E10)$ berechnet und beziehen sich auf das 9E10-Fab, das aus der proteolytischen Abspaltung des IgG stammt.

K_D-Bestimmung zum myc-tag-Peptid (EQKLISEEDLN)

Der in dieser Arbeit ermittelte K_D des 9E10-Fab zum myc-tag-Peptid im ELISA mit 620 ± 350 nM unterscheidet sich nicht signifikant von dem in *E. coli* rekombinant hergestellten 9E10-Fab mit einem $K_D = 500 \pm 200$ nM (Tabelle 6.10.).

Tabelle 6.10. : Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und der freien Standardenergie ΔG° von Fab 9E10 und Rückmutanten bei der Bindung an das myc-tag-Peptid im ELISA. Die $\Delta\Delta G^\circ$ -Werte zeigen hier die energetischen Änderungen bei jeder Rückmutation relativ zu 9E10⁽¹⁾. Mit (1) gekennzeichnetes Fab wurde aus dem IgG durch partielle Proteolyse erhalten.

Fab	myc-tag-Peptid EQKLISEEDLN (ELISA)			
	K_D (M)	ΔG° (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	Abnahme der Affinität, relativ zu 9E10 ⁽¹⁾
9E10 ⁽¹⁾	$6,2 \pm 3,5 \times 10^{-7}$	-35,4		
9E10	$5 \pm 2 \times 10^{-7}$	-36		keine Änderung
9E10 H ^{H58} Y	$8,4 \pm 1,1 \times 10^{-7}$	-34,7	0,7	keine Änderung
9E10 H ^{H31} S	$1,15 \pm 0,04 \times 10^{-6}$	-33,9	1,5	~ 2-fach
9E10 T ^{L91} S	$1,8 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	-32,8	2,6	~ 3-fach
9E10 R ^{H53} G	$4,7 \pm 2,6 \times 10^{-6}$	-30,4	5,0	~ 8-fach
9E10 G ^{H52} S	nicht auswertbar			
9E10 F ^{L30} I	nicht auswertbar			
9E10 S ^{H100b} Y	nicht auswertbar			
L _{Keimbahn} /H _{9E10}	nicht auswertbar			
L _{9E10} /H _{Keimbahn}	nicht detektierbar			
L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	nicht detektierbar			

Das Bindungsverhalten der Keimbahnrückmutanten kann daher im Vergleich zum 9E10-Fab, entstanden aus der partiellen Proteolyse des IgG, charakterisiert werden. ΔG° der

Bindungsreaktion für den 9E10-Fab ist mit -35,4 kJ/mol stark exergonisch und befindet sich im Bereich biologisch relevanter Reaktionen (-20 bis -80 kJ/mol).

Den größten Verlust in der freien Standardenergie mit 5 kJ/mol bei der Bindung an das myc-tag-Peptid liefert die V_H-Rückmutation R^{H53} zu G (K_D = 4,7 ± 2,6 µM) im mutierten Fab. Die Rückmutationen T^{L91} zu S in V_L (K_D = 1,8 ± 0,2 µM) und H^{H31} zu S in V_H (K_D = 1,15 ± 0,04 µM) beeinflussen ΔG° mit Verlusten von 2,6 und 1,5 kJ/mol nur leicht und führen nur zur einer geringen Abnahme in der Affinität. Die Rückmutation H^{H58} zu Y (K_D = 840 ± 110 nM) hat keinen Einfluss auf die Affinität. Die Prüfung der weiteren Keimbahnrückmutanten auf Bindung im Verdrängungs-ELISA ergab, dass die gemischte Keimbahnrückmutante L_{Keimbahn}/H_{9E10} eine sehr schwache Bindung an das myc-tag-Peptid zeigte. Bei L_{9E10}/H_{Keimbahn} und L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} war hingegen keine Bindung an das myc-tag-Peptid detektierbar. Die Einzelrückmutanten 9E10 F^{L30}I, G^{H52}S und S^{H100h}Y haben mit einem sehr schwachen Signal an das myc-tag-Peptid gebunden, das keine genaue Bestimmung des K_D-Wertes zuließ.

K_D-Bestimmung zum c-myc(408-427)-Peptid (AEEQKLISEEDLLRKRREQL)

Mit Verlängerung des Epitops fällt auch der K_D des 9E10-Fab von 620 ± 350 nM auf 6,8 ± 1,6 nM (Abb. 6.11. und Tabelle 6.12.) um das 90-fache, dabei sinkt die freie Standardenergie von -35,4 kJ/mol auf -46,6 kJ/mol. Die Affinität zum verlängerten myc-Peptid (20-mer) nimmt also zu. Die relative Affinität der myc-Peptide zum 9E10-Fab wird durch den Unterschied im ΔG° der Bindung nach: $\Delta(\Delta G^\circ)_{\text{myc (408-427)} - \text{myc-tag}} = RT (\ln K_{D \text{ myc(408-427)}} - \ln K_{D \text{ myc-tag}})$ wiedergegeben. So ergibt sich in den ELISA-Experimenten ein $\Delta(\Delta G^\circ)_{\text{myc (408-427)} - \text{myc-tag}} = -11,2$ kJ/mol. Das verlängerte myc-Peptid bringt also einen Gewinn von 11,2 kJ/mol für die freie Standardenergie der Bindung. Damit werden Affinitätsmessungen für die Rückmutanten 9E10 G^{H52}S, S^{H100h}Y, F^{L30}I, L_{Keimbahn}/H_{9E10}, L_{9E10}/H_{Keimbahn} und L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} möglich, die mit dem kürzeren myc-tag-Peptid nicht möglich oder nicht auswertbar waren.

Der Austausch von F^{L30} durch das im Keimbahngen VL21-2* kodierte I erhöht den K_D um das 6-fache auf 38 ± 4 nM, was einen Verlust von 4,2 kJ/mol für die freie Standardenergie bedeutet. Während im 9E10-Fab die Rückmutationen G^{H52}S (K_D = 6,3 ± 0,7 nM) den K_D nicht signifikant beeinflusst, verursacht S^{H100h}Y mit einem Anstieg im K_D auf 59 ± 6 nM die größte Affinitätseinbusse (5,3 kJ/mol) von allen in dieser Arbeit beschriebenen Einzelrückmutanten.

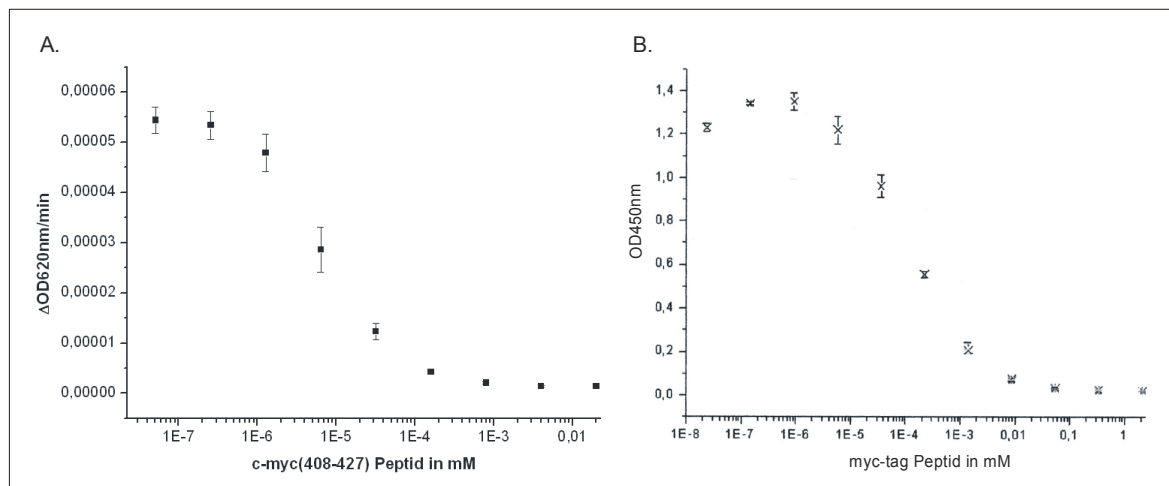


Abb.6.11. : Vergleich der Bindung des 9E10-Fab an das lösliche (A.) 20-mer c-myc(408-427)-Peptid, das mit einer höheren Affinität gebunden wird, und (B.) an das 11-mer myc-tag-Peptid in einem kompetitiven ELISA.

Tabelle 6.12. : Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und der freien Standardenergie ΔG° von Fab 9E10 und von den Rückmutanten bei der Bindung an das c-myc(408-427)-Peptid im ELISA. Die $\Delta\Delta G^\circ$ -Werte zeigen hier die energetischen Änderungen bei jeder Rückmutation relativ zu 9E10⁽¹⁾. Mit (1) gekennzeichnetes Fab wurde aus dem IgG durch partielle Proteolyse erhalten.

Fab	c-myc(408-427)-Peptid AEEQKLISEEDLLRKREQL (ELISA)			
	K_D (M)	ΔG° (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	Abnahme der Affinität, relativ zu 9E10 ⁽¹⁾
9E10 ⁽¹⁾	$6,8 \pm 1,6 \times 10^{-9}$	-46,6		
9E10 R ^{H53} G	$12 \pm 6 \times 10^{-9}$	-45,2		keine Änderung
9E10 G ^{H52} S	$6,3 \pm 0,7 \times 10^{-9}$	-46,8		keine Änderung
9E10 F ^{L30} I	$3,8 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	-42,4	4,2	~ 6-fach
9E10 S ^{H100h} Y	$5,9 \pm 0,6 \times 10^{-8}$	-41,3	5,3	~ 9-fach
L _{Keimbahn} /H _{9E10}	$7,6 \pm 2,4 \times 10^{-7}$	-34,9	11,7	~ 100-fach
L _{9E10} /H _{Keimbahn}	$5,3 \pm 3,3 \times 10^{-6}$	-30,1	16,5	~ 800-fach
L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	$\sim 2 \times 10^{-3}$	~ -15	~ 31	~ 300000-fach

Daten aus der Kristallstrukturanalyse zeigen die schwere variable Domäne mit dem größten Anteil an der Bindung zum myc-tag-Peptid (Krauß et al., 2007). Mit vierzehn Hypermutationen in der Affinitätsreifung ist sie die Domäne mit den meisten Austauschen. Im ELISA-Experiment verliert das 9E10-Fab durch die vierzehn Rückmutationen in der V_H-

Domäne ca. 800-mal an Affinität ($K_D = 5,3 \pm 3,3 \mu\text{M}$). Die V_L -Domäne mit sechs Rückmutationen bringt einen ca. 100-fachen Affinitätsverlust ($K_D = 760 \pm 240 \text{ nM}$). Die Rückmutation der schweren variablen Domäne in $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ hat mit 16,5 kJ/mol einen stärkeren Verlust für die freie Standardenergie zur Folge als die Rückmutation der leichten variablen Domäne in $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ mit 11,7 kJ/mol.

Die Bindung des Fab $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ an das immobilisierte 20-mer c-myc(408-427)-Peptid konnte im ELISA zwar noch nachgewiesen werden, ließ sich aber mit sogar 8 mM freiem Peptid nicht vollständig verdrängen. Der im Verdrängungs-ELISA errechnete K_D liegt bei ca. 2 mM, was einen sehr hohen Verlust (ca. 31 kJ/mol) für die freie Standardenergie der Bindung bedeutet. Die Analyse der Spezifität der Bindung an das freie myc(408-427)-Peptid im ELISA erfolgte mit einem statistisch in den Positionen veränderten Peptid, basierend auf der Aminosäurezusammensetzung des c-myc(408-427)-Peptides (Abb. 6.13.).

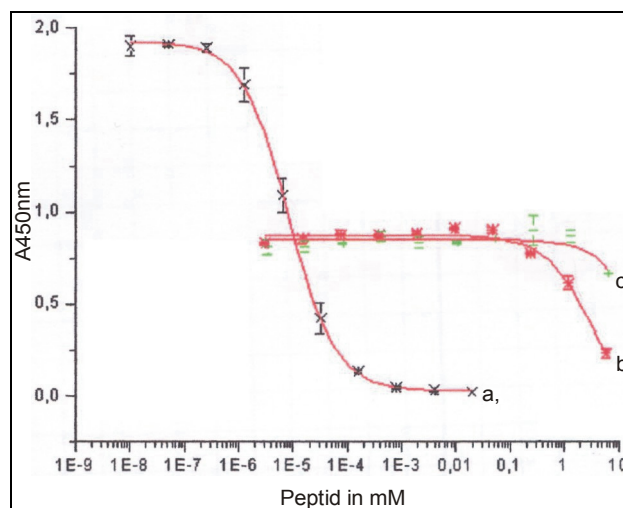


Abb. 6.13. : **Kompetition der Bindung von (a.) 9E10-Fab und (b., c.) von Fab der kompletten 9E10-Keimbahnrückmutante an das immobilisierte c-myc(408-427) Peptid mit (a., b.) löslichem c-myc(408-427) bzw. (c.) einem randomisierten Peptid (LDIKLQERESRKLQRQEEAEL) im ELISA.**

Im Verdrängungs-ELISA nimmt das Bindungssignal erst bei einer Konzentration von 6,6 mM an freiem randomisiertem Peptid ab. Diese Daten zeigen im ELISA eine sehr schwache Affinität des Fab-Fragmentes des 9E10-Vorläufers zum verlängerten löslichen myc-Peptid, was aber dennoch gebunden wird. Trotz der schlechten Bindung könnte das Fab $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ kodiert durch die Keimbahngene VH 3:3.39, DFL16,1 und JH4 für V_H und

VL21-2* und J1 für V_L der Vorläufer vom 9E10 sein. Spätere Bindungsexperimente bestätigen dies.

Die Keimbahnrückmutante 9E10 R^{H53}G ($K_D = 12 \pm 6$ nM) weist, verglichen mit dem 9E10-Fab ($K_D = 6,8 \pm 1,6$ nM), nur geringere Affinitätsänderungen zum 20-mer c-myc(408-427)-Peptid auf. Kalkuliert man den hier aufgetretenen Fehler mit ein, unterscheidet sich das Bindungsverhalten dieser Mutante in der Affinität nicht vom 9E10-Fab. Aus diesem Grunde wurden diese Rückmutanten sowie die Rückmutanten 9E10 T^{L91}S und H^{H31}S, die bereits geringe Unterschiede in der Affinität zum myc-tag-Peptid aufweisen, in ihrer Bindung ausschließlich zum myc-tag-Peptid charakterisiert.

Durch die Charakterisierung der Bindung der Keimbahnrückmutanten zu beiden myc-Varianten konnten geringe und größere Unterschiede in der Affinitätsänderung besser herausgestellt werden.

6.6.1.2 Bestimmung von K_D und der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} mit SPR

Der Einfluss der Rückmutationen im 9E10-Fab auf die Kinetik der Ausbildung der Fab-myc-Peptid-Komplexe erfolgte mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz an der Biacore. Gemessen wurden für diese Reaktionen die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} (1/Ms) und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} (1/s). Die Berechnung dieser Konstanten erfolgte mit Hilfe der Biaevaluation Software unter der Annahme eines einfachen Modells einer reversiblen einstufigen Bindung im Verhältnis 1 zu 1: Fab + Peptid \rightleftharpoons Fab-Peptid. Mit diesem Model ließen sich die experimentellen Daten gut beschreiben.

Das Cys-myc-tag-Peptid und das Cys-myc(408-427)-Peptid wurden jeweils über den N-Terminus an der Oberfläche des CM5-Biacorechips immobilisiert, und das Fab von 9E10 und den Keimbahnrückmutanten wurde über die Chipoberfläche geleitet. Die Bindungsstärke wurde aus den gemessenen k_{on} - und k_{off} -Daten errechnet und als Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D (M) wiedergegeben ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Aus der Gleichgewichtskonstante K_D wurden die freie Standardenergie ΔG° und deren Änderungen abgeleitet. Zusätzlich zu diesen Messungen wurde auch ein K_D der Bindung des 9E10-Fab an das myc-tag-Peptid aus Gleichgewichtstitrationen ermittelt.

Bindung des 9E10-Fab an das myc-tag- (EQKLISEEDLN) und c-myc(408-427)-Peptid (AEEQKLISEEDLLRKRREQL)

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bei der Bindung des 9E10-Fab an das myc-tag- und c-myc(408-427)-Peptid zeigt eine Veränderung in beiden Konstanten zugunsten einer höheren Affinität des 9E10-Fab zum verlängerten myc-Peptid (Tabelle 6.14.).

Tabelle 6.14. : Vergleich der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bei der Bindung der Keimbahnrückmutanten und des gereiften 9E10-Fab an die myc-Peptide. Die Konstanten wurden mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz ermittelt. Mit (1) gekennzeichnetes Fab wurde aus dem IgG durch partielle Proteolyse erhalten. Die Änderungen in den Konstanten sind relativ zu 9E10-Fab⁽¹⁾.

Fab	myc-tag-Peptid EQKLISEEDLN (SPR)			
	$k_{on} (10^3 M^{-1} s^{-1})$	Abnahme k_{on}	$k_{off} (10^{-3} s^{-1})$	Zunahme k_{off}
9E10 ⁽¹⁾	$2,54 \pm 0,04$		$2,30 \pm 0,04$	
9E10	$2,1 \pm 0,2$	keine Änderung	$1,78 \pm 0,05$	keine Änderung
9E10 H ^{H58} Y	$1,86 \pm 0,04$	keine Änderung	$2,1 \pm 0,1$	keine Änderung
9E10 H ^{H31} S	$1,99 \pm 0,01$	keine Änderung	$4,79 \pm 0,02$	~ 2
9E10 T ^{L91} S	$1,32 \pm 0,02$	~ 2	$9,13 \pm 0,04$	~ 4
9E10 R ^{H53} G	$0,15 \pm 0,01$	~ 20	$3,24 \pm 0,02$	>1
Fab	myc(408-427)-Peptid AEEQKLISEEDLLRKRREQL (SPR)			
	$k_{on} (10^3 M^{-1} s^{-1})$	Abnahme k_{on}	$k_{off} (10^{-3} s^{-1})$	Zunahme k_{off}
9E10 ⁽¹⁾	99 ± 4		$0,12 \pm 0,03$	
9E10 F ^{L30} I	70 ± 1	>1	$0,86 \pm 0,03$	~ 7
9E10 G ^{H52} S	$2,28 \pm 0,04$	~ 40	$0,11 \pm 0,05$	keine Änderung
9E10 S ^{H100h} Y	$2,34 \pm 0,03$	~ 40	$0,19 \pm 0,04$	keine Änderung
L _{Keimbahn} /H _{9E10}	$8,49 \pm 0,02$	~ 10	$3,67 \pm 0,02$	~ 30
L _{9E10} /H _{Keimbahn}	$1,7 \pm 0,1$	~ 60	$0,8 \pm 0,1$	~ 7
L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	$1,14 \pm 0,02$	~ 90	$4,46 \pm 0,05$	~ 40

Die Verlängerung des Peptides verändert die Assoziationskinetik des 9E10-Fabs von einer langsamen ($k_{on} = 2,54 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$) zu einer mittelschnellen ($k_{on} = 9,9 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$) um das ca. 40-fache. Die Dissoziation der Komplexe ändert sich von mittelschnell dissoziierend ($k_{off} = 2,3 \times 10^{-3} s^{-1}$) zu langsam dissoziierend ($k_{off} = 1,2 \times 10^{-4} s^{-1}$) um das ca. 20-fache. Die höhere Affinität zum myc(408-427)-Peptid kommt also durch eine stärkere Änderung von k_{on} als von k_{off} zustande. K_D der Bindung von 9E10-Fab zum myc(408-427)-Peptid sinkt hier um das ca.

750-fache von 902 ± 1 nM auf $1,2 \pm 0,3$ nM. Der $\Delta(\Delta G^\circ)_{\text{myc (408-427)} - \text{myc-tag}}$ beträgt $-16,3 \pm 1,3$ kJ/mol.

Die Assoziationsgeschwindigkeit an das myc-tag-Peptid, die für das in *E. coli* rekombinant hergestellte 9E10-Fab mit $2,1 \pm 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt wurde, weicht unwesentlich vom k_{on} des 9E10-Fab ($k_{\text{on}} = 2,54 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ab, das proteolytisch vom IgG abgespalten wurde. Gleiches trifft auch für den k_{off} zu, der $1,78 \pm 0,05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für das rekombinante und $2,30 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für das nicht rekombinante 9E10-Fab bei der Bindung an das 20-mer-Peptid beträgt. Änderungen in den Konstanten, bedingt durch Rückmutationen im 9E10, wurden dann als gegeben angesehen, wenn es zu signifikanten Abweichungen zu den Konstanten von 9E10-Fab aus der partiellen Proteolyse des IgG und vom rekombinant hergestellten Fab kam. K_D der Bindung vom rekombinanten 9E10-Fab an das myc-tag-Peptid beträgt 800 ± 100 nM (siehe auch Tabelle 6.18.).

Mit der SPR-Methode an der Biacore konnte bei einer Laufgeschwindigkeit von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ für 2 min keine Sättigung der myc-tag-Peptidbindungsfläche an der Chipoberfläche mit 9E10-Fab (gewonnen aus der Proteolyse des 9E10-IgG) erreicht werden (Abb. 6.15.A). Die Abbildung 6.15.B. zeigt die Bindung des 9E10-Fab an das verlängerte 20-mer c-myc-Peptid(408-427) bei einer Laufgeschwindigkeit von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ für 2 min, auch hier wird keine Sättigung der Peptidbindungsfläche erreicht. Eine Sättigung trat erst bei einer Geschwindigkeit von $1 \mu\text{l}/\text{min}$ für 15 min ein (Abb. 6.16.). Der K_D von 830 nM ergab sich aus der Konzentration an 9E10-Fab bei halber Signalsättigung. Ein K_D von 814 ± 141 nM errechnete sich aus dem Quotienten der ermittelten kinetischen Konstanten k_{off} und k_{on} ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) der selben Messung.

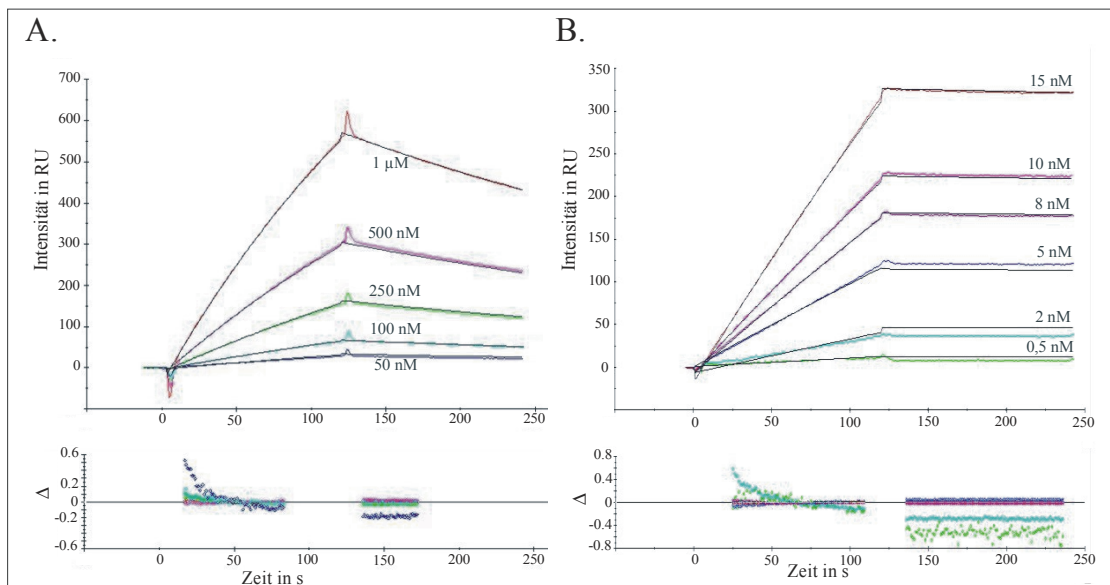


Abb. 6.15. : **Bestimmung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} bei der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen des 9E10-Fab an das (A.) myc-tag- und (B.) c-myc(408-427)-Peptid mit der SPR-Methode.** Die Laufgeschwindigkeit des Puffers beträgt 10 μ l/min. Die unteren Graphen zeigen die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem Modell der Ein-Schritt-Bindung. Δ gibt die Abweichung zwischen den experimentell ermittelten Werten und dem mathematischen Modell an.

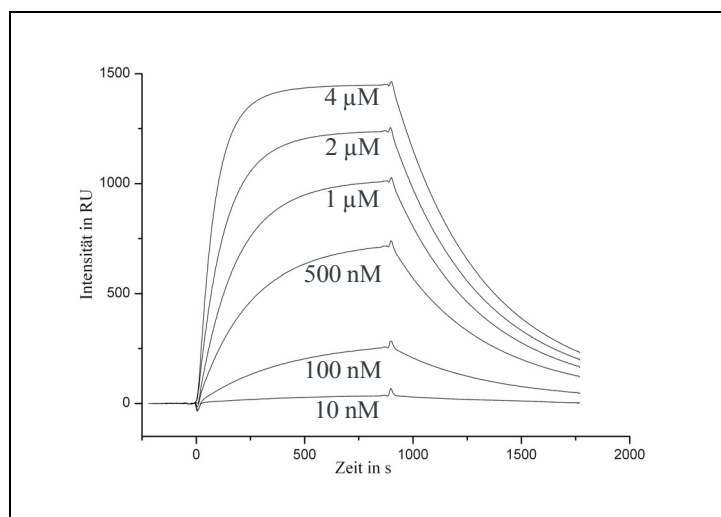


Abb.6.16. : **Bestimmung des K_D der Bindung des 9E10-Fab an das myc-tag-Peptid mit der SPR-Methode.** SPR-Sensorgramm der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von 9E10-Fab an die myc-tag-Peptid beschichtete Chipoberfläche bei einer Pufferlaufgeschwindigkeit von 1 μ l/min.

Einfluss der Rückmutationen im 9E10-Fab auf die Bindung

Die Messung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} bei der Bindung der Fab-Fragmente der Keimbahnrückmutanten an die myc-Peptide zeigt eine Veränderung dieser Konstanten ausgelöst durch die Rückmutationen im 9E10. Deutlich wird dies beim Vergleich der 9E10-Rückmutante mit dem gereiften 9E10-Fab. Die höhere Affinität des 9E10-Fab zum c-myc(408-427)-Peptid resultiert aus einer Beschleunigung der Assoziation von $k_{on} = 1,14 \pm 0,02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf $k_{on} = 0,99 \pm 0,04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um das ca. 90-fache und aus einer Verlangsamung der Dissoziation der Komplexe um das ca. 40-fache von $k_{off} = 4,46 \pm 0,05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf $k_{off} = 1,2 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 6.14.). Hier zeigt sich auch ein unterschiedlicher Beitrag der beiden variablen Domänen zu den Kinetiken der Bindungsreaktion.

Die folgende Abbildung 6.17. beschreibt die Bindung des Fab-Fragmentes der kompletten 9E10-Rückmutante an das c-myc-(408-427)-Peptid an der Biacore, gemessen nach der Methode der SPR.

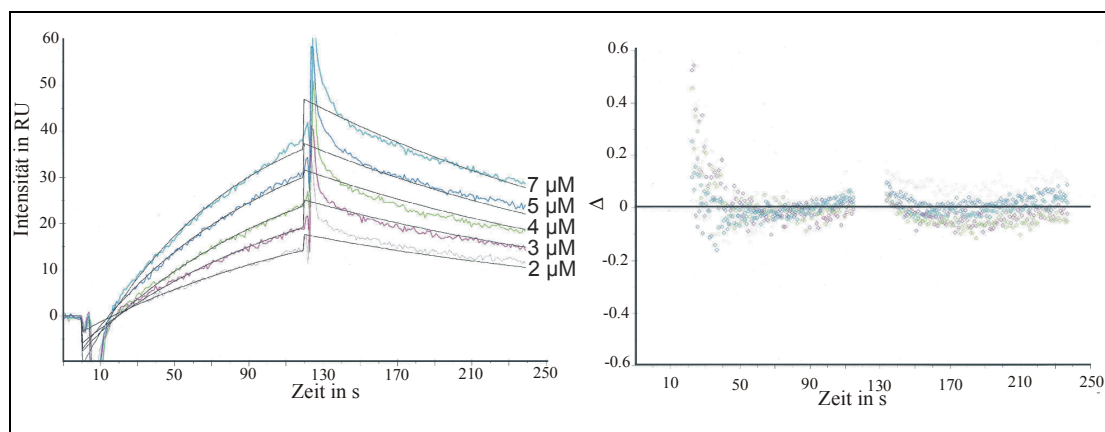


Abb. 6.17. : SPR-Sensorgramm der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen der kompletten Fab-Keimbahnrückmutante $H_{\text{Keimbahn}}/L_{\text{Keimbahn}}$ an das c-myc(408-427)-Peptid und die Übereinstimmung der Daten mit dem Modell der Ein-Schritt-Bindung. Δ gibt die Abweichung zwischen den experimentell ermittelten Werten und dem mathematischen Modell an.

Einfluss der V_H -Rückmutationen im 9E10-Fab auf die Bindung

Die größte Abnahme für die Assoziationsgeschwindigkeit (um das 60-fache) liefert die komplett rückmutierte V_H -Domäne im 9E10-Fab (Tabelle 6.14.). Die Assoziationsgeschwindigkeit verlangsamt sich auf $1,7 \pm 0,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, wenn man V_H im

9E10-Fab auf die Sequenz der Keimbahngene VH 3:3.39, DFL16.1 und JH4 rückmutiert. Die Dissoziationsgeschwindigkeit unterliegt leichteren Änderungen, sie nimmt um einen Faktor von ca. 7 auf $0,8 \pm 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ zu, was bedeutet, dass die Komplexe an stabilisierender Energie verloren haben. Von den in dieser Arbeit getesteten Einzelmückmutationen zeigen ausschließlich die Substitutionen in der V_H -Domäne, nämlich G^{H52} zu S ($k_{on} = 2,28 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), R^{H53} zu G ($k_{on} = 0,15 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und S^{H100h} zu Y ($k_{on} = 2,34 \pm 0,03 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), den größten Einfluss auf die Änderung von k_{on} bei der Bindung an die myc-Peptide unter den hier gewählten Bedingungen. Die Bindung von 9E10-Fab mit der Rückmutation $R^{H53}G$ an das myc-tag-Peptid führt zu einer ca. 20-fachen Abnahme der Assoziationsgeschwindigkeit ($k_{on} = 0,15 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Bei den Rückmutationen $G^{H52}S$ und $S^{H100h}Y$ sind jeweils ca. 40-fache Abnahmen in der Assoziationsgeschwindigkeit bei der Bindung des Fabs an das c-myc(408-427)-Peptid zu verzeichnen. Die Unterschiede in der Dissoziationsgeschwindigkeit der Fab-Fragmente von 9E10 $G^{H52}S$ ($k_{off} = 0,11 \pm 0,05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und 9E10 $S^{H100h}Y$ ($k_{off} = 0,19 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zum 9E10-Fab liegen im Bereich der Standardabweichungen. Die Rückmutation $R^{H53}G$ im 9E10-Fab beschleunigt leicht die Dissoziation der Komplexe auf einen k_{off} von $3,24 \pm 0,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Eine Ausnahme stellen die Rückmutationen H^{H31} zu S und H^{H58} zu Y dar, wobei das Fab des 9E10 $H^{H58}Y$ bei der Bindung an das myc-tag-Peptid keinen Einfluss auf den k_{off} nimmt ($k_{off} = 2,1 \pm 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und auch keinen auf den k_{on} ($k_{on} = 1,86 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), wenn man die Schwankung im k_{on} für den 9E10-Fab mit einbezieht. Der Austausch von H^{H31} zu S beschleunigt dagegen die Dissoziationsgeschwindigkeit des Fabs vom myc-tag-Peptid um das ca. 2-fache ($k_{off} = 4,79 \pm 0,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und trägt auf diese Weise zur einer leichten Komplexdestabilisierung bei. Im Gegensatz zu den Rückmutanten 9E10 $G^{H52}S$, $R^{H53}G$ und $S^{H100h}Y$ hat $H^{H31}S$ keinen Einfluss auf k_{on} ($k_{on} = 1,99 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Es fällt auf, dass die Rückmutationen $G^{H52}S$, $R^{H53}G$ und $S^{H100h}Y$, also die mit den größten Betragsänderungen für k_{on} innerhalb der hier untersuchten Einzelmückmutanten, den k_{off} nicht oder, wie im Falle von $R^{H53}G$, nur schwach beeinflussen.

Einfluss der V_L -Rückmutationen im 9E10-Fab auf die Bindung

Bei der Reifung des Keimbahn-kodierten 9E10-Vorläufers zum 9E10 wird die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe durch Mutationen in der V_L -Domäne stärker beeinflusst als durch die in der V_H -Domäne (Tabelle 6.14.). Mutiert man V_L im 9E10-Fab zurück auf das Keimbahngenen 21-2*, verlangsamt sich die Assoziation um das 10-fache auf k_{on}

$= 8,49 \pm 0,02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziation wird dagegen um das 30-fache beschleunigt, was sich in einem $k_{\text{off}} = 3,67 \pm 0,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ widerspiegelt. Die Einzelrückmutationen F^{L30} zu I und T^{L91} zu S im 9E10-Fab haben eine schwache Wirkung auf die Assoziationsgeschwindigkeit, jedoch die größte auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von den getesteten Einzelrückmutanten. Das 9E10-Fab mit der Rückmutation F^{L30}I assoziiert mit $k_{\text{on}} = 0,7 \pm 0,01 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ an das myc(408-427)-Peptid. Dagegen beeinflusst diese Rückmutation den k_{off} um das ca. 7-fache. Die Dissoziation der Komplexe beschleunigt sich mit dieser Rückmutation im 9E10-Fab auf $k_{\text{off}} = 0,86 \pm 0,03 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Die T^{L91} zu S Rückmutation im 9E10-Fab senkt die Assoziationsgeschwindigkeit der Komplexe ca. 2-mal auf $k_{\text{on}} = 1,32 \pm 0,02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, beschleunigt jedoch die Dissoziationsgeschwindigkeit ca. 4-mal auf $k_{\text{off}} = 9,13 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Der aus den kinetischen Konstanten errechnete K_D der Bindung der Fabs zum immobilisierten myc-tag-Peptid steigt in der Reihenfolge der 9E10-Rückmutationen H^{H31}S ($K_D = 2,41 \pm 0,0002 \text{ } \mu\text{M}$) um das ca. 3-fache, T^{L91}S ($K_D = 6,9 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{M}$) um das ca. 8-fache und bei R^{H53}G ($K_D = 22 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$) um das ca. 20-fache an (Tabelle 6.18.).

Tabelle 6.18. : **Darstellung des K_D der Bindung des 9E10-Fab und seiner Rückmutanten an das myc-tag bzw. myc(408-427)-Peptid, errechnet aus k_{on} und k_{off} , die nach der SPR-Methode gemessen wurden.** Die $\Delta\Delta G^\circ$ -Werte zeigen hier die energetischen Änderungen bei jeder Rückmutation relativ zu 9E10⁽¹⁾. Mit (1) gekennzeichnetes Fab wurde aus dem IgG durch partielle Proteolyse erhalten.

Fab	myc-tag-Peptid EQKLISEEDLN (SPR)			
	K_D (M)	ΔG° (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	Abnahme der Affinität, relativ zu 9E10 ⁽¹⁾
9E10 ⁽¹⁾	$9,02 \pm 0,01 \times 10^{-7}$	-34,3		
9E10	$8 \pm 1 \times 10^{-7}$	-34,6		keine Änderung
9E10 H ^{H58} Y	$1,1 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	-33,8		keine Änderung
9E10 H ^{H31} S	$2,41 \pm 0,0002 \times 10^{-6}$	-31,9	2,4	~ 3-fach
9E10 T ^{L91} S	$6,9 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	-29,3	5	~ 8-fach
9E10 R ^{H53} G	$2,2 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	-26,4	7,8	~ 20-fach
9E10 F ^{L30} I	nicht detektierbar			
9E10 G ^{H52} S	nicht detektierbar			
9E10 S ^{H100n} Y	nicht detektierbar			
L _{Keimbahn} /H _{9E10}	nicht detektierbar			
L _{9E10} /H _{Keimbahn}	nicht gemessen			
L _{Keimbahn} /H _{Keimbahn}	nicht gemessen			

Fab	c-myc(408-427)-Peptid AEEQKLISEEDLLRKRRQL (SPR)			
	K_D (M)	ΔG° (kJ/mol)	ΔΔG° (kJ/mol)	Abnahme der Affinität, relativ zu 9E10⁽¹⁾
9E10⁽¹⁾	$1,2 \pm 0,3 \times 10^{-9}$	-50,7		
9E10 F^{L30I}	$1,23 \pm 0,03 \times 10^{-8}$	-44,8	5,8	~ 10-fach
9E10 G^{H52S}	$5 \pm 2 \times 10^{-8}$	-41,6	9,1	~ 40-fach
9E10 S^{H100hY}	$8 \pm 2 \times 10^{-8}$	-40,2	10,5	~ 70-fach
L_{Keimbahn}/H_{9E10}	$4,32 \pm 0,02 \times 10^{-7}$	-36,1	14,6	~ 360-fach
L_{9E10}/H_{Keimbahn}	$4,8 \pm 0,2 \times 10^{-7}$	-35,9	14,8	~ 400-fach
L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}	$3,93 \pm 0,04 \times 10^{-6}$	-30,6	20	~ 3300-fach

Der ΔG° der Bindung erhöht sich dabei von -34,4 kJ/mol um 2,4; 5,0 und 7,8 kJ/mol. Die Rückmutation H^{H58}Y im Fab 9E10 ($K_D = 1,1 \pm 0,1 \mu M$) ändert die Affinität zum myc-tag-Peptid nicht. Bei der Bindung an das immobilisierte c-myc(408-427)-Peptid erhöht sich der K_D des 9E10-Fab mit der Rückmutation F^{L30I} ($K_D = 12,3 \pm 0,3 nM$) um das ca. 10-fache, mit G^{H53S} ($K_D = 50 \pm 20 nM$) um das ca. 40-fache, mit S^{H100hY} ($K_D = 80 \pm 20 nM$) um das ca. 70-fache, mit L_{Keimbahn} ($K_D = 432 \pm 2 nM$) um das ca. 360-fache sowie mit H_{Keimbahn} ($K_D = 480 \pm 20 nM$) um das ca. 400-fache und schließlich mit der kompletten Rückmutation um das ca. 3300-fache auf $3,93 \pm 0,04 \mu M$. Der ΔG° der Bindung steigt dabei von -50,7 kJ/mol um 5,8; 9,1; 10,5; 14,6; 14,8 und 20 kJ/mol auf -30,6 kJ/mol.

6.6.2 Charakterisierung der Bindungsspezifität

6.6.2.1 Substitutionsanalysen an c-myc-Peptiden

In den Substitutionsanalysen am myc-Peptid wird jede Position des zu untersuchenden Peptides durch die zwanzig Gen-kodierten Aminosäuren ausgetauscht. Pro Peptidspot erfolgt ein Austausch. In der äußeren linken Spalte der Matrix (zusehen in den Abbildungen der Substitutionsanalysen) wurden Peptide mit der Wildtypsequenz synthetisiert, während in den übrigen Spalten Peptide mit jeweils einem Austausch synthetisiert wurden. Da durch alle zwanzig Gen-kodierten Aminosäuren ausgetauscht wird, entstehen so pro Reihe zwei Peptidspots mit der Wildtypsequenz. Auf diese Weise kann die Spezifität des Antikörpers zu einzelnen Punktmutanten des Peptides geklärt und Schlüsselpositionen im Peptid ermittelt

werden. Der Nachweis der Bindung der Fab-Fragmente an die Peptide war durch eine Chemilumineszenzreaktion mit einem gegen murine Immunglobulindomänen gerichteten HRP-markierten Antikörper möglich. Die Intensität der Lumineszenz korreliert mit der Bindungsstärke der Fab-Fragmente an die Peptide. Die folgenden Abbildungen sind eine Negativdarstellung der detektierten Lumineszenz. Je dunkler der Spot auf der Matrix desto stärker die Bindung.

Eine Substitutionsanalyse am 11-mer myc-tag-Peptid konnte mit allen in dieser Arbeit getesteten Rückmutanten durchgeführt werden, bis auf die komplette 9E10-Rückmutante L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}, die keine nachweisbare Bindung an das myc-tag-Peptid aufwies. Mit dem Fab L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} waren jedoch Substitutionsanalysen an den höher affinen c-myc-Peptiden 408-427; 410-427 und an einem modifizierten c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid möglich. Zuzüglich wurden die Fabs L_{Keimbahn}/H_{9E10} und L_{9E10}/H_{Keimbahn} in ihrer Spezifität zum substituierten c-myc(408-427) Peptid charakterisiert. Außerdem wurde die Bindungsspezifität zu den c-myc-Peptiden mit der Länge 408-427; 408(E⁴⁰⁹F)-427 und 410-427 auch für das 9E10-Fab charakterisiert. Substitutionsanalysen mit dem kurzen und schwachaffinen 8-mer c-myc(412-419)-Peptid waren stark von der Bindungsstärke und der Verfügbarkeit an Fab aus der Expression in *E. coli* abhängig und nur mit den Fabs 9E10, 9E10 H^{H58}Y, H^{H31}S, G^{H52}S und L_{Keimbahn}/H_{9E10} möglich. Beim Vergleich zwischen dem aus der partiellen Proteolyse des 9E10-IgG stammenden Fab und dem rekombinant exprimierten Fab in den Substitutionsanalysen an dem 8-mer c-myc(412-419)-, dem 11-mer myc-tag- und dem 20-mer c-myc(408-427)-Peptid konnte kein Unterschied in dem Substitutionsmuster festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die folgende Tabelle 6.19. stellt eine Übersicht über die getesteten Substitutionsanalysen an den myc-Peptiden mit dem 9E10-Fab und den 9E10-Rückmutanten dar.

Hilpert et al. (2001) machten in den Substitutionsanalysen am 11-mer und dem schwächer affinen 8-mer Peptid die Beobachtung, dass mit abnehmender Affinität des 9E10-Antikörpers zum 8-mer Peptid die Schlüsselpositionen scheinbar selektiver erkannt werden, da nur wenige Substitutionen toleriert wurden. Auch in dieser hier vorliegenden Arbeit wird die gleiche Feststellung gemacht. Hilpert et al. führen dies auf einen verminderten Sättigungseffekt bei der Messung der Signale zurück, wodurch die Unterschiede zwischen den Signalen deutlicher hervortreten. In der vorliegenden Arbeit konnte die selbe Beobachtung für die Bindung der schwächer affinen 9E10-Rückmutanten gemacht werden. Zudem werden an weiteren Peptidpositionen einige Substituenten signifikant schlechter und andere besser toleriert. Diese beobachteten Effekte korrelieren mit abnehmender Gesamtaffinität des 9E10 bzw. der

Rückmutanten zu den Peptiden. Zudem ist es auffällig, dass immer die selben Substitutionen besser bzw. schlechter toleriert werden. Demzufolge wurden in der vorliegenden Arbeit die Signale, die nicht in dieses Schema passen als ein Indiz für eine Spezifitätsänderung angesehen. In den folgenden graphischen Darstellungen sind die in Prozent angegebenen Intensitäten für die Bindung der Fab-Fragmente an die substituierten Peptide relativ zu den gemittelten Intensitäten für die Bindung an das Wildtyppeptid auf der jeweiligen Membran (100%) angegeben. In vergleichenden Analysen werden die Fab-Fragmente zum besseren Verständnis nach abnehmender Affinität zum Wildtyppeptid, bestimmt nach der ELISA- und SPR-Methode, von links nach rechts sortiert.

Tabelle 6.19. : **Übersicht über die Substitutionsanalysen an den myc-Peptiden mit dem Fab von 9E10 bzw. der Rückmutanten.** Die intensiven Bindungssignale an das Wildtyppeptid sind mit „+“, die schwachen mit „(+)" und die nicht detektierbaren mit „-“ gekennzeichnet. Mit (1) gekennzeichnetes Fab wurde aus dem IgG durch partielle Proteolyse erhalten. Die Abkürzung n. g. steht für nicht gemessen.

Fab	Bindungssignal an Wildtyppeptid in den Substitutionsanalysen am:				
	8-mer (412-419)	11-mer myc-tag	20-mer (408-427)	18-mer (410-427)	20-mer (408(E ⁴⁰⁹ F)-427)
9E10⁽¹⁾	+	+	+	+	+
9E10	+	+	+	n. g.	n. g.
9E10 H^{H31}S	+	+	n. g.	n. g.	n. g.
9E10 G^{H52}S	(+)	+			
9E10 R^{H53}G	-	+			
9E10 H^{H58}Y	+	+			
9E10 S^{H100h}Y	-	+			
9E10 F^{L30}I	-	+			
9E10 T^{L91}S	-	+			
L_{Keimbahn}/H_{9E10}	(+)	+	+		
L_{9E10}/H_{Keimbahn}	-	+	+		
L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}	-	-	(+)	+	+
Kontrolle des Nachweisantikörpers	-	-	-	-	n. g.

Substitutionsanalysen am 20-mer c-myc(408-427)-Peptid (AEEOKLISEEDLLRKRREOL)

Mit den Substitutionsanalysen am 20-mer-Peptid wird die Spezifitätsänderung des vollständig Keimbahn-rückmutierten 9E10 und der 9E10-Fabs mit der einzelrückmutierten V_L bzw. V_H -Domäne an dem 20-mer Peptid c-myc(408-427) analysiert. Darüber hinaus wird das 9E10-Fab erstmals in seiner Bindungsspezifität zu diesem längeren Peptid beschrieben. Da die murinen Fab-Fragmente von einem anti-Maus-Antikörper-HRP detektiert wurden, war eine zusätzliche Kontrolle einer möglichen Bindung des Nachweisantikörpers an das myc-Peptid notwendig. Die Kontrolle zeigt eine polyspezifische Bindung des Detektionsantikörpers anti-Maus-Ig an einige Substituenten des myc-Peptides (Position 418: F, I, L, T, V und Y, Abb. 6.20.). Sie wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Das 9E10-Fab zeigt auch im 20-mer eine sehr selektive Erkennung der Schlüsselpositionen LISE (Abb. 6.20.), wie bereits von Hilpert et al. (2001) für das 11-mer myc-tag- und 8-mer c-myc(412-419)-Peptid beschrieben (siehe auch Abb. 3.10). Ebenfalls sehr selektiv im c-myc(408-427)-Peptid wird der Rest L^{P419} erkannt. Basierend auf diesen Daten wurde die Schlüsselregion um die Position L^{P419} auf LISEXXL erweitert. Die aus der Verlängerung des N-Terminus stammenden zwei Aminosäuren (408-409) als auch die letzten vier Aminosäuren (424-427) aus der Verlängerung des C-Terminus werden vom 9E10-Fab nicht selektiv erkannt. Die Positionen $Q^{411}KLISEEDLLRKR^{423}$ im 20-mer Peptid können dagegen zum selektiv erkannten Bereich des 9E10 gezählt werden, da diese Region mit einer höheren Selektivität vom 9E10-Fab erkannt wird (Abb. 6.20.). Auch bei der Bindung der schwächer affinen Rückmutante $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ an das 20-mer Peptid wird es deutlicher, dass dieser Bereich mit einer höheren Selektivität erkannt wird. Die Bindung des 9E10-Fab an das 18-mer Peptid (Abb. 6.27.) zeigt ebenfalls die höhere Selektivität von 9E10 zu diesem Bereich. Die Längenanalysen am myc-Peptid im Kapitel 6.6.2.2. (Abb. 6.31.) belegen zudem, dass die Verlängerung des Peptides (EQKLISEEDL) um die C-terminalen Reste LRKR zu einem Affinitätsgewinn bei der Bindung an das 9E10-Fab führt. Dieses zeigt, dass das Epitop des 9E10 um die vier Aminosäuren LRKR am C-Terminus länger sein kann, als das in der Literatur beschriebene. Auch die nicht nachweisbare Bindung (ELISA- (Tabelle 6.10.), SPR- (Tabelle 6.18.) und Peptidspot-Analysen (Tabelle 6.19.)) der kompletten 9E10-Rückmutante an das 11-mer myc-tag-Peptid, das die in der Literatur beschriebene Epitopsequenz EQKLISEEDL beinhaltet, deutet auf ein längeres Epitop hin. Auffällig ist die Aminosäure P, die nur an den Termini (408-411 und 422-427) des 20-mer Peptides vom 9E10-Fab toleriert wird.

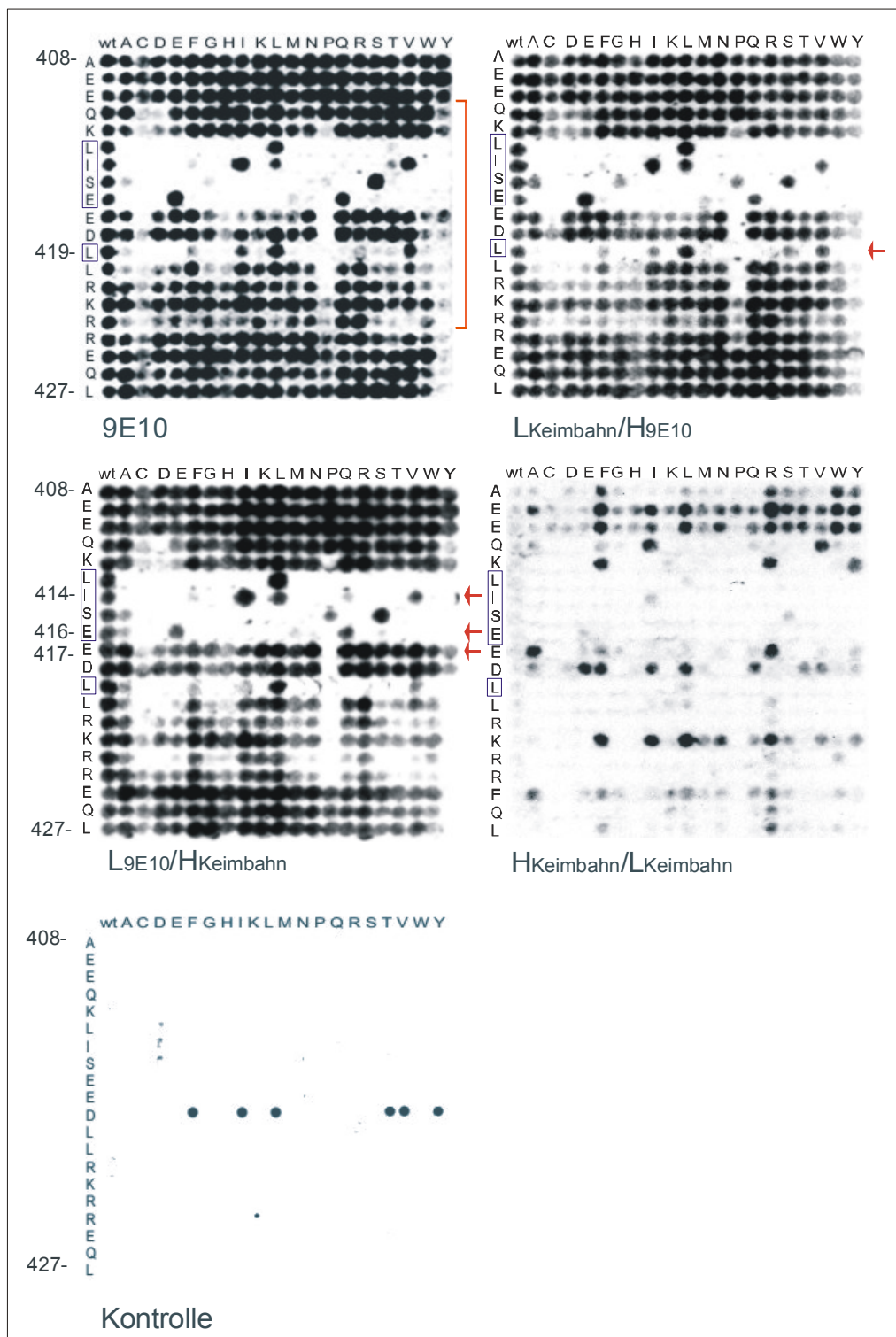


Abb. 6.20. : Substitutionsanalysen am c-myc(408-427)-Peptid mit 9E10-Fab sowie den Keimbahnrückmutanten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$, $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$, und $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$. Die Substitutionsmatrizes sind von links nach rechts nach den abnehmenden Affinitäten der Fabs zum Wildtyppeptid (bestimmt mit der ELISA-Methode) sortiert. Die Kontrolle erfolgte mit dem Detektionsantikörper ohne 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten). Die Schlüsselpositionen sind eingerahmt und die Pfeile deuten auf Änderungen in der Selektivität. Die rote Markierung zeigt den mit einer höheren Selektivität erkannten Bereich des 9E10-Fab-Fragmentes.

Zudem erkennt die Rückmutante $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ P in den 20-mer Peptiden ausschließlich an der N-terminalen Position 409. Allerdings ist die Bindung der kompletten 9E10-Rückmutante an das auf der Membran synthetisierte 20-mer Peptid auch sehr schwach.

Einfluss der rückmutierten V_L -Domäne auf die Bindungsspezifität

Mit der komplett rückmutierten V_L -Domäne im Fab $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ kommt es kaum zu Spezifitätsänderungen des Antikörpers zum 20-mer Peptid. Eine einzige Ausnahme betrifft eine Toleranz gegenüber S an der Schlüsselposition L^{P419} . Dies deutet auf eine leicht abnehmende selektive Erkennung des Restes L^{P419} . Die übrigen Schlüsselpositionen werden sehr selektiv von $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ erkannt.

Einfluss der rückmutierten V_H -Domäne auf die Bindungsspezifität

Die komplette Rückmutation der V_H -Domäne bewirkt ebenfalls nur schwache Änderungen in der selektiven Erkennung der Schlüsselpositionen LISEXSL im 20-mer Peptid. Die rückmutierte V_H -Domäne im 9E10-Fab bewirkt jedoch eine schwache Bindung des Antikörpers an substituierte Peptide mit einem Q an der Schlüsselposition I^{P414} . Der Rest Q^{P414} wird von dieser Rückmutante nur in 20-mer Peptid und nicht im 11-mer myc-tag-Peptid (Abb. 6.22.) nachweislich toleriert. Peptide mit dem Substituenten A an der Schlüsselposition E^{P416} werden schwach gebunden. Stärkere Änderungen in der Spezifität des Fabs $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ betreffen jedoch die Erkennung der Nicht-Schlüsselposition E^{P417} . Am Rest 417 werden I, K und L stärker toleriert (Abb. 6.21.). Hier kommt es trotz abnehmender Gesamtaffinität von $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ nicht zu einer scheinbar höheren selektiven Erkennung dieser Position E^{P417} , wie es z. T. für $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ zu erkennen ist. Somit führen Rückmutationen in der V_H -Domäne zu einer geringfügig abnehmenden Spezifität des Antikörpers zum 20-mer Peptid. Die Abb. 6.21. zeigt die stärkere Bindung von Fab $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ an die gegen I, K und L substituierten Peptide an der Position 417 im Vergleich zu 9E10-Fab und $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ -Fab.

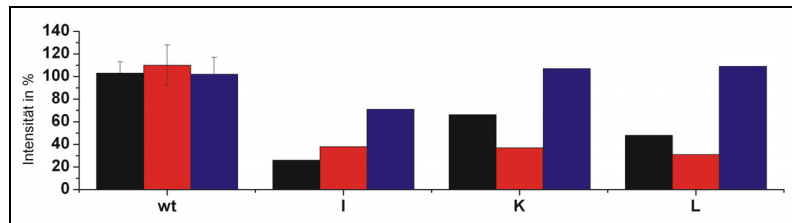


Abb. 6.21. : Graphische Darstellung der abnehmenden selektiven Erkennung der Position E^{P417} bedingt durch Rückmutationen in dem Fab-Fragment $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ (blau). Das 9E10-Fab (schwarz) und $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ -Fab (rot) dienen dem Vergleich. Gezeigt wird die Bindung an ausgewählte an der Position 417 gegen I, K und L substituierte 20-mer c-myc(408-427)-Peptide in den Substitutionsanalysen. Die Bindung an das Wildtyppeptid in der selben Substitutionsreihe dient dem Vergleich.

Einfluss der 9E10-Keimbahnrückmutante auf die Bindungsspezifität

Die Bindung der kompletten 9E10-Keimbahnrückmutante an das Wildtyppeptid in den Substitutionsanalysen ist sehr schwach. Mit dieser Analyse konnte dennoch gezeigt werden, dass $L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}$ mit der selektiven Erkennung der Schlüsselreste LISEXSL funktionell und ein potentieller Vorläufer des 9E10 ist. Die selektive Erkennung der Schlüsselreste, die in den Substitutionsanalysen am Peptid durch keine weiteren Reste bzw. nur durch physikochemisch ähnliche Reste austauschbar sind, ist ein typisches Merkmal des 9E10-Antikörpers. Das grundlegende Bindungsverhalten an das Antigen ist beim 9E10 und seinen hier gezeigten Keimbahnrückmutanten gleich. Auch die Fab-Rückmutanten $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ und $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ erkennen die Schlüsselpositionen LISEXSL, bis auf wenige geringfügige Ausnahmen, sehr selektiv (Abb. 6.20.).

Im Vergleich zum 9E10-Fab unterscheiden sich die 9E10-Fabs mit den einzelrückmutierten V-Domänen $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ und $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ in der Bindungsspezifität zum 20-mer Peptid nur an wenigen Stellen. Die Rückmutationen der einzelnen V-Domänen führen zu einer schwach abnehmenden Spezifität des Antikörpers. Rückmutationen in der V_H -Domäne haben jedoch einen stärkeren Einfluss auf die Spezifität.

Substitutionsanalysen am 11-mer myc-tag- Peptid (EOKLISEEDLN)

Mit den Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid werden, bis auf L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}, alle in dieser Arbeit beschriebenen Rückmutanten – 9E10 F^{L30}I, T^{L91}S, H^{H31}S, G^{H52}S, R^{H53}G, H^{H58}Y, S^{H100h}Y, L_{9E10}/H_{Keimbahn} und L_{Keimbahn}/H_{9E10} – in der Bindungsspezifität zu einem Peptid analysiert (Abb. 6.22.).

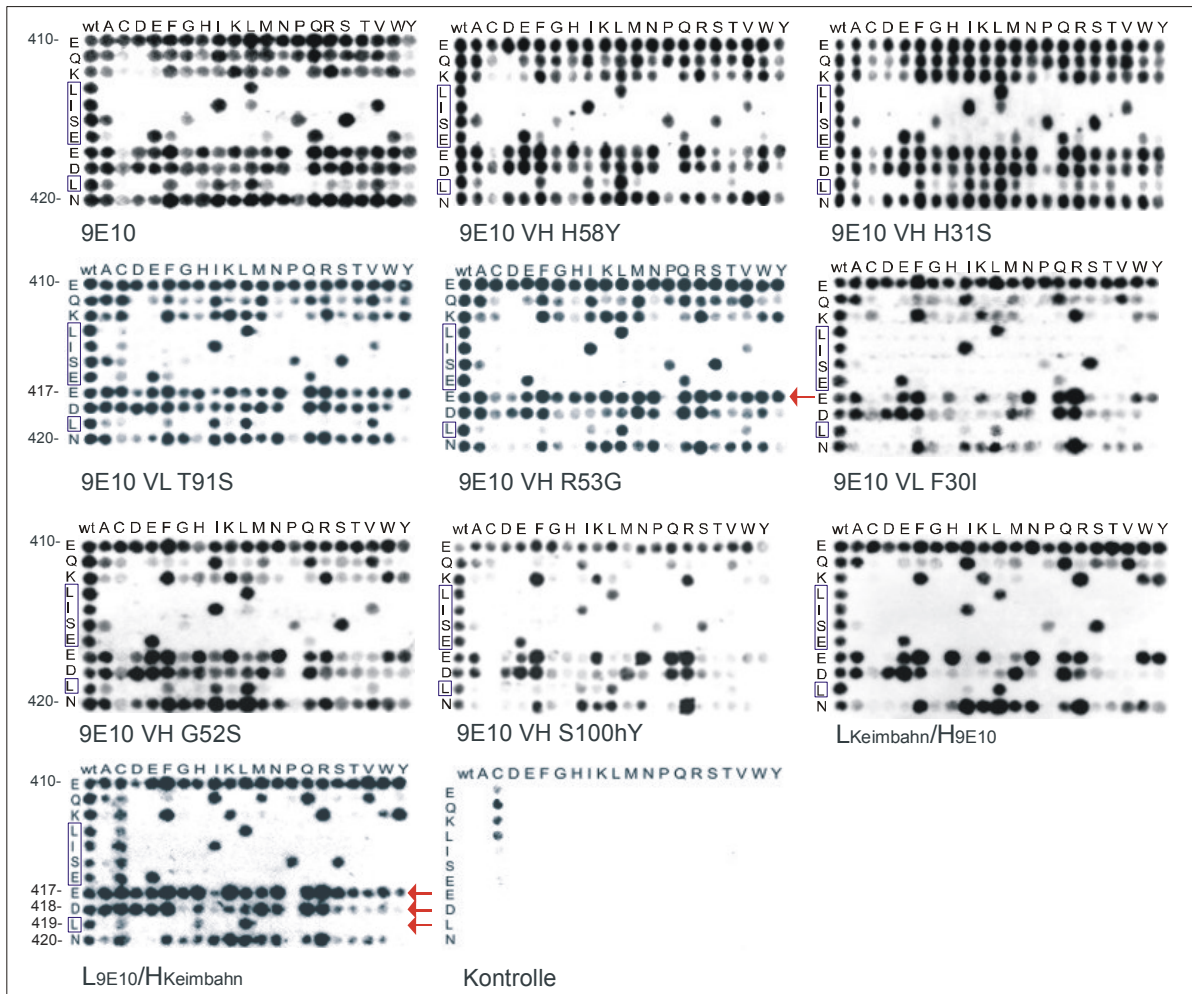


Abb.6.22. : Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid mit den Keimbahnrückmutanten 9E10 H^{H58}Y, H^{H31}S, G^{H52}S, R^{H53}G, S^{H100h}Y, F^{L30}I, T^{L91}S, L_{9E10}/H_{Keimbahn}, L_{Keimbahn}/H_{9E10} und mit 9E10-Fab zum Vergleich. Die Substitutionsanalysen sind von links nach rechts nach den abnehmenden Affinitäten (bestimmt mit der SPR-Methode) der Fab-Fragmente zum Wildtyppeptid sortiert. Die Kontrolle erfolgte mit dem Detektionsantikörper ohne 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten). Die Schlüsselpositionen sind eingerahmt und die Pfeile deuten auf Änderungen in der Selektivität.

Hier war es gelungen feine Unterschiede in der Bindungsspezifität der 9E10-Rückmutanten zu erkennen. Aufgrund der Bindung des Nachweisantikörpers an Peptide mit Cystein als Substituenten werden diese in die Auswertung nicht miteinbezogen, obwohl in den Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid mit den Fab-Fragmenten auch den Cysteinresten eine funktionelle Bedeutung zukommt.

Einfluss der Rückmutationen in der V_L -Domäne auf die Bindungsspezifität

Sowohl 9E10-Fab mit den Einzelmückmutationen $F^{L30}I$ und $T^{L91}S$ in der V_L -Domäne als auch das 9E10-Fab mit der komplett rückmutierten V_L -Domäne ergeben ein ähnliches Substitutionsmuster bei der Bindung an substituierte myc-tag-Peptide, das sich lediglich in den Intensitäten der Bindung zu einigen Peptidsubstituenten unterscheidet und mit der abnehmenden Gesamtaffinität der Fabs korreliert (Abb. 6.22.). Dies ist auf den bereits oben beschriebenen verminderten Sättigungseffekt zurückzuführen. Diese Rückmutationen haben keinen Einfluss auf die Bindungsspezifität.

Einfluss der Rückmutationen in der V_H -Domäne auf die Bindungsspezifität

Das 9E10-Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ weist eine veränderte Selektivität zu der Peptidregion 417-419 bei der Bindung an das myc-tag-Peptid auf (Abb. 6.22.). Hier nehmen die Intensitäten der Bindung zu einigen Peptidsubstituenten nicht ab, wie mit abnehmender Affinität zum Wildtyppeptid zu erwarten wäre und bei den V_L -Rückmutanten ($F^{L30}I$, $T^{L91}S$ und $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$) auch beobachtet wurde. Die Peptide mit den Substituenten D, G, L, M, S, T und V an der Position 417 werden von $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ im Gegensatz zu $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ stärker gebunden (Abb. 6.23.A.). Zum Rest D^{P418} im myc-tag-Peptid weist das Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ im Vergleich zu $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ ebenfalls eine veränderte Selektivität auf. Insbesondere myc-tag-Peptide mit den Resten H, K, L und N an der Position 418 werden von $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ intensiver gebunden (Abb. 6.23.C.).

In der Erkennung der Schlüsselposition L^{P419} unterscheiden sich beide V-Domänen darin, dass ein Peptid mit H an dieser Position von $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ im Gegensatz zu $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ gebunden wird. Es zeigt sich, dass die Änderungen in der selektiven Erkennung der Position E^{P417} im myc-tag-Peptid von der Einzelmückmutation $R^{H53}G$ bewirkt werden. Die Einzelmückmutation $R^{H53}G$ im 9E10-Fab bewirkt eine zunehmende Affinität zu Peptiden mit den Austauschen L, M, S, T und V an der Position 417 (Abb. 6.23.B.).

Die Abbildung 6.23.B. zeigt die scheinbar zunehmende Selektivität der V_L -Rückmutanten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ und $9E10\ T^{L91}S$ in der Erkennung der Position E^{P417} , die mit der abnehmenden Gesamtaffinität dieser Rückmutanten korreliert. Die Rückmutante $9E10\ T^{L91}S$ wurde hier zum Vergleich herangezogen, da sie eine höhere Gesamtaffinität zum 11-mer Peptid aufweist als $9E10\ R^{H53}G$. Die V_H -Rückmutanten $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ und $9E10\ R^{H53}G$ zeigen hingegen eine abnehmende Selektivität in der Erkennung der Position E^{P417} im myc-tag-Peptid.

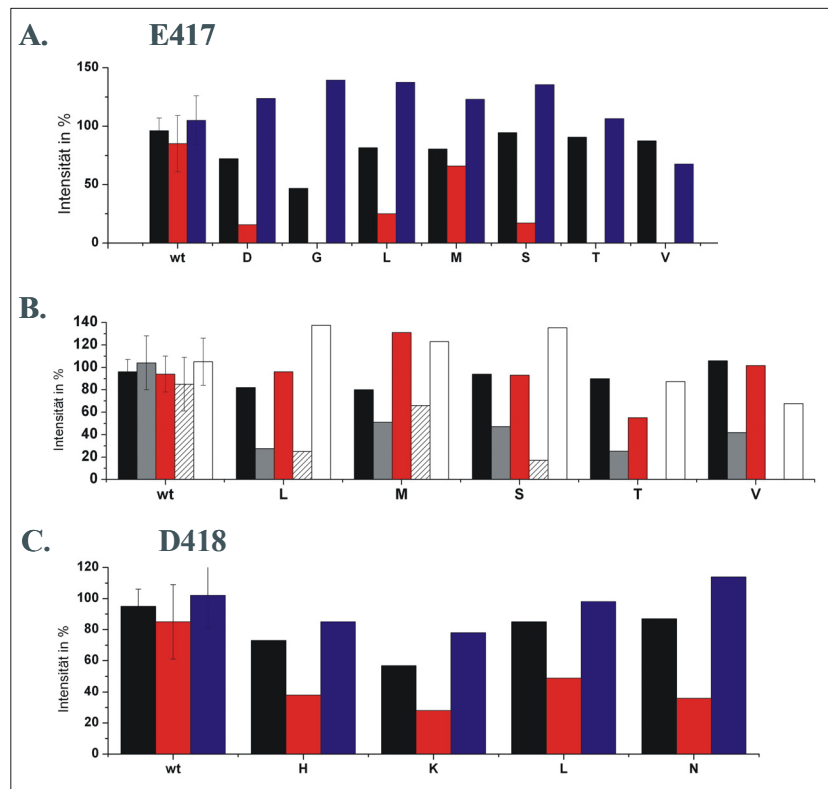


Abb. 6.23. : Graphische Darstellung der abnehmenden selektiven Erkennung des myc-tag-Peptidrestes E^{P417} bedingt durch Rückmutationen in den Fabs $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ und $9E10\ R^{H53}G$ (A. und B.) und des Restes D^{P418} bedingt durch Rückmutationen in dem Fab $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ (C.). (A., C.) Gezeigt werden die Intensitäten der Bindung des $9E10$ (schwarz) und $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ (rot) im Vergleich zu $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ (blau) an ausgewählte an der Position 417 (A.) und 418 (C.) substituierte Peptide in den Substitutionsanalysen. In (B.) wird die Bindung der Einzelmückmutante $9E10\ R^{H53}G$ (rot) an die an der Position 417 substituierten Peptide mit der der Fabs $9E10$, $9E10\ T^{L91}S$ (grau), $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ (gestrichelt) und $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ (weiß) verglichen. Die Bindung an das Wildtyppeptid in der selben Substitutionsreihe dient dem Vergleich.

Die Rückmutanten 9E10 G^{H52}S und S^{H100h}Y weisen ein zu den Rückmutanten der V_L-Domäne ähnliches Substitutionsmuster auf. Diese Rückmutanten haben keinen Einfluss auf die Bindungsspezifität. Auch die Einzelrückmutation H^{H58}Y führt zu keiner nachweisbaren Spezifitätsänderung des 9E10-Fab unter den hier gewählten Bedingungen. Für die Rückmutante 9E10 H^{H31}S konnte zum 11-mer Peptid ebenfalls keine signifikante Spezifitätsänderung beobachtet werden.

Rückmutationen in der V_H-Domäne verursachen hier eine deutlich abnehmende Spezifität des Antikörpers zum myc-tag-Peptid. Mit der geringfügigen Ausnahme der Schlüsselposition L^{P419} werden die Schlüsselpositionen LISEX_{XL} von allen Rückmutanten sehr selektiv erkannt. Zu Änderungen in der Selektivität kommt es bei der Erkennung der peripheren Reste, insbesondere der Reste E^{P417} und D^{P418}. Verantwortliche für die Selektivitätsabnahme zu der Position E^{P417} im myc-tag-Peptid ist die Rückmutation des im direkten Kontakt zum Peptid stehenden 9E10-Restes R^{H53}, der zu G mutiert wurde.

Substitutionsanalysen am 8-mer c-myc(412-419)-Peptid (KLISEEDL)

Mit diesem Experiment sollen noch feinere Bindungsunterschiede der Rückmutanten an das Antigen, als es mit der Bindung an das myc-tag-Peptid möglich war, beschrieben werden.

Soweit es die Ausbeute an funktionellem Fab aus der rekombinanten Expression in *E. coli* und die Affinität der rückmutierten Fabs an das verkürzte und schwächer affine c-myc(412-419)-Peptid ($K_D = 26 \mu\text{M}$ für 9E10-IgG, ELISA, Hilpert et al., 2001) erlaubten, konnten für einige 9E10-Rückmutanten Substitutionsanalysen an diesem Peptid durchgeführt werden (Abb. 6.24.).

In den Substitutionsanalysen am verkürzten Peptid wurde das Bindungsverhalten der 9E10-Rückmutanten H^{H31}S, H^{H58}Y, G^{H52}S und L_{Keimbahn}/H_{9E10} analysiert (Abb. 6.24.), wobei die Substitutionsanalyse mit dem gereiften 9E10-Fab einem Vergleich diene. Betrachtet werden nun vor allem Änderungen in der Bindungsspezifität zu diesem Peptid, die spezifisch für eine der getesteten Rückmutationen sind. Das Fab 9E10-H^{H58}Y bindet das Peptid KLISEEDL mit der gleichen Spezifität wie das 9E10-Fab. In den Substitutionsanalysen am c-myc(412-419)-Peptid wird jedoch eine verminderte Selektivität des Fab zum Rest E^{P417} beobachtet, deren Ursache die Rückmutation H^{H31}S ist (Abb. 6.24.).

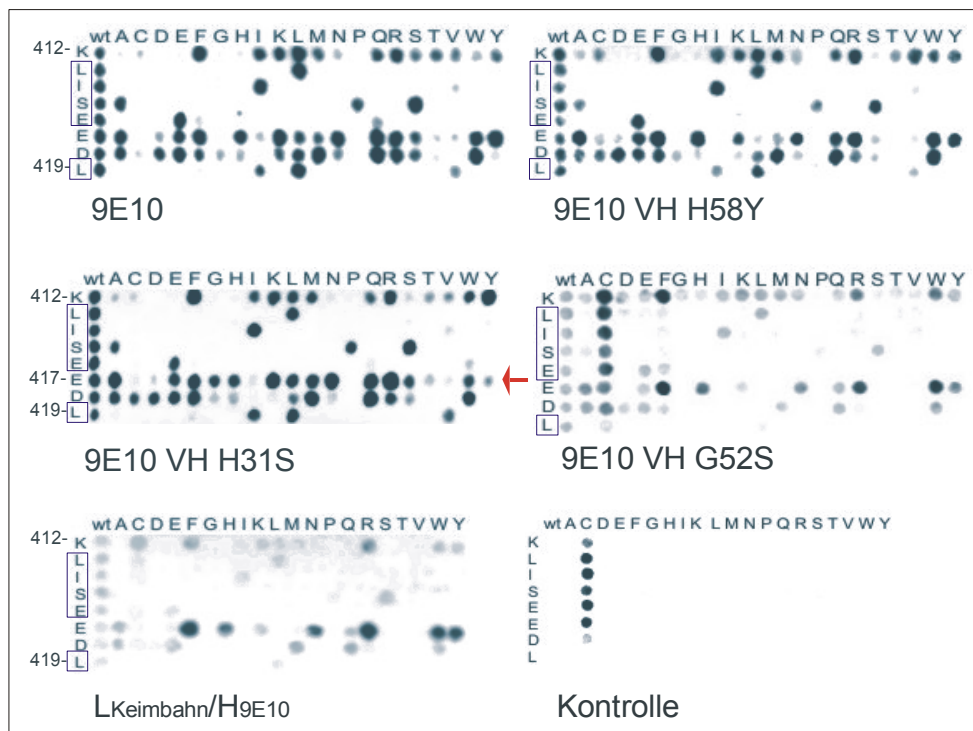


Abb. 6.24: Substitutionsanalysen am c-myc(412-419)-Peptid mit den Fab-Keimbahnrückmutanten $H^{H58}Y$, $H^{H31}S$, $G^{H52}S$, $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ und 9E10. Die Substitutionsanalysen sind von links nach rechts nach den abnehmenden Affinitäten der Fab-Fragmente zum Wildtypen des 11-mer myc-tag-Peptides (bestimmt mit der ELISA-Methode) sortiert. Die Kontrolle erfolgte mit dem Detektionsantikörper ohne 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten). Die Schlüsselpositionen sind eingerahmt und der Pfeil deutet auf Änderungen in der Selektivität.

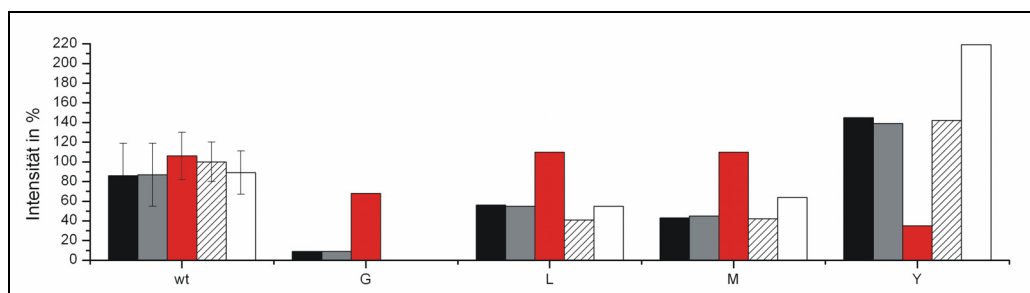


Abb. 6.25. : Graphische Darstellung der abnehmenden selektiven Erkennung der Position E^{P417} im 8-mer c-myc(412-419)-Peptid bedingt durch die Fab-Einzelmückmutation $H^{H31}S$ im 9E10 (rot). Gezeigt wird die Bindung an ausgewählte an der Position 417 gegen G, L, M und Y substituierte 8-mer Peptide in den Substitutionsanalysen. Zum Vergleich ist die Intensität der Bindung an die jeweiligen Peptide der Fabs 9E10 (schwarz), $H^{H58}Y$ (grau), $G^{H52}S$ (gestrichelt) und $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ (weiß) gezeigt. Die Bindung an das Wildtyppeptid in der selben Substitutionsreihe dient dem Vergleich.

Die Rückmutation des im direkten Kontakt zum Peptid stehenden Restes H^{H31} zu S bewirkt eine stärkere Bindung des Antikörpers an Peptide mit den Austauschen G, L und M an der Position 417 im Vergleich zu der der Fabs 9E10, 9E10 H^{H58}Y, 9E10 G^{H52}S und L_{Keimbahn}/H_{9E10} (Abb. 6.25.). Die Affinität zu Peptiden mit Y an der Position 417 nimmt dagegen ab (Abb. 6.25.).

Aufgrund der sehr schwachen Gesamtaffinität von Fab 9E10 G^{H52}S zum 8-mer Peptid kann keine Aussage über weitere feinere Unterschiede im Vergleich zum gereiften 9E10 in der Bindungsspezifität dieser Rückmutante gemacht werden. Das gleiche trifft für das Fab L_{Keimbahn}/H_{9E10} zu, aber auch für die übrigen schwachaffinen 9E10-Rückmutanten, die aus den genannten Gründen in ihrer Bindungsspezifität zum verkürzten Peptid schwer zu charakterisieren wären. Die Schlüsselpositionen LISEXXL werden von den hier untersuchten Rückmutanten mit einer hohen Selektivität erkannt. Eine geringfügige Ausnahme zeigt das Fab 9E10 G^{H52}S, das ein F an der Schlüsselposition E^{P416} im myc-tag-Peptid stärker toleriert als das 9E10-Fab.

Substitutionsanalysen am 20-mer c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid (AFEOKLISEEDLLRKREQL)

Diese Analyse dient dazu, die Gesamtaffinität der kompletten 9E10-Rückmutante zum Peptid durch Aminosäureaustausche außerhalb des Epitopbereiches zu erhöhen, um höhere Bindungssignale in den Substitutionsanalysen zu erreichen. Zur Auswahl der Positionen, die für einen Austausch geeignet sind, wurden die Daten aus der Substitutionsanalyse am 20-mer Peptid herangezogen (Abb. 6.20.). Als geeignet schien der Austausch von E^{P409} zu F am N-Terminus des 20-mer Peptides

Die Substitutionsanalyse an diesem modifizierten 20-mer(E⁴⁰⁹F)-Peptid belegt, dass das in den Substitutionsanalysen am 20-mer Peptid mit einer signifikant höheren Affinität gebundene gegen F substituierte Peptid (Abb. 6.20.) keine unspezifische Wechselwirkung der kompletten 9E10-Keimbahnenrückmutante mit dieser Peptidvariante darstellt. An diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass auch hier die Schlüsselpositionen LISEXXL von der kompletten Keimbahnenrückmutante sehr selektiv erkannt werden. Hiermit konnte die Funktionalität und die Zugehörigkeit der gewählten Keimbahngensegmente zum 9E10-Antikörper eindeutig bestätigt werden.

Auch das gereifte 9E10-Fab bindet das substituierte 20-mer-Pepid mit einer höheren Affinität, jedoch nur geringfügig (Abb. 6.26.). Trotz der hohen Signalsättigung, die auf eine hohe Gesamtaffinität des gereiften 9E10-Fab zu diesem Peptid zurückzuführen ist, werden die Schlüsselpositionen LISEXSL selektiv erkannt, wobei hier eine Hierarchie in der Selektivität zu den Schlüsselpositionen zu erkennen ist. Der Rest L^{P413} wird mit der höchsten Selektivität und der Rest L^{P419} mit der niedrigsten Selektivität unter den Schlüsselpositionen erkannt.

Die Substitutionsanalyse am modifizierten 20-mer c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid zeigt jedoch ein vom Originalpeptid abweichendes Substitutionsmuster. Der N-Terminus (409-411) des veränderten 20-mer myc-Peptides wird mit einer veränderten Selektivität erkannt (Abb. 6.26., siehe auch Abb. 6.27. und 6.20.). So werden an der Position Q^{P411} kaum Aromaten und aliphatische Reste wie I, L und V, stattdessen aber das polare N, im Peptid toleriert. Bei der Bindung der kompletten 9E10-Rückmutante an das c-myc(408-427)-Peptid ist es genau umgekehrt. Zudem wird die Position E^{P417} viel selektiver erkannt, vor allem werden an dieser Position nur noch A, G und Q toleriert. Hier konnte gezeigt werden, dass ein modifizierter N-Terminus im Peptid nicht nur die Affinität zur 9E10-Keimbahnrückmutante erhöht, sondern auch die Erkennung einiger Positionen im Peptid durch die Rückmutante verändert.

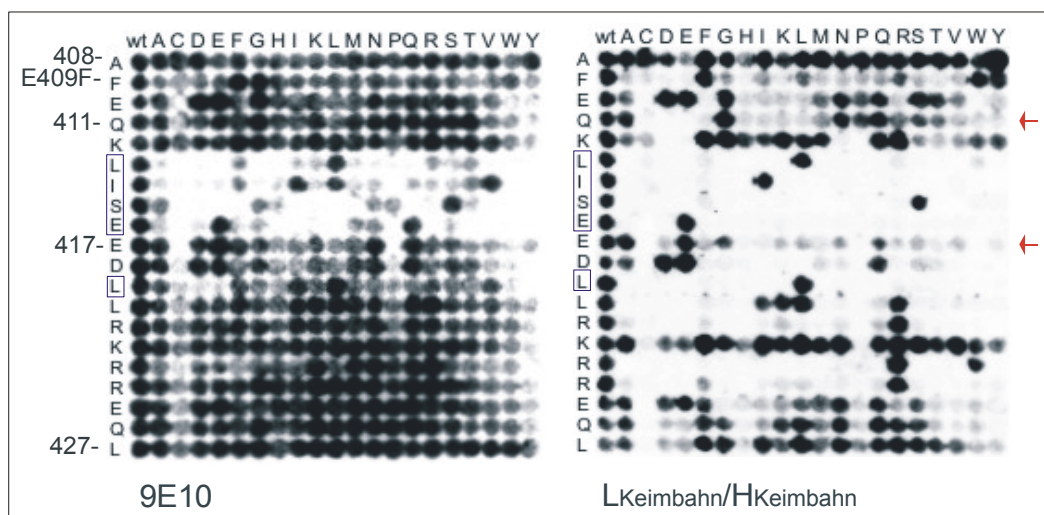


Abb. 6.26. : Substitutionsanalysen am c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid mit 9E10-Fab sowie der Fab-Keimbahnrückmutante L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}. Die Schlüsselpositionen sind eingerahmt und die Pfeile deuten auf Änderungen in der Selektivität.

Substitutionsanalysen am 18-mer c-myc(410-427)-Peptid (EOKLISEEDLLRKRREQL)

Die Kürzung des 20-mer Peptides um die zwei N-terminalen Aminosäuren A^{P408} und E^{P409} auf ein 18-mer Peptid (410-427) ermöglichte nun die genaue Charakterisierung der Erkennung der Schlüsselpositionen LISEXXL durch die 9E10-Keimbahnenrückmutante an einem Peptid mit einer unveränderten Sequenz.

In der Substitutionsanalyse am 18-mer Peptid waren aufgrund einer höheren Gesamtaffinität der 9E10-Keimbahnenrückmutante zum Peptid (Abb. 6.27.) mehr Bindungssignale an die substituierten Peptide nachweisbar als in den Analysen am N-terminal längeren 20-mer c-myc(408-427)-Peptid.

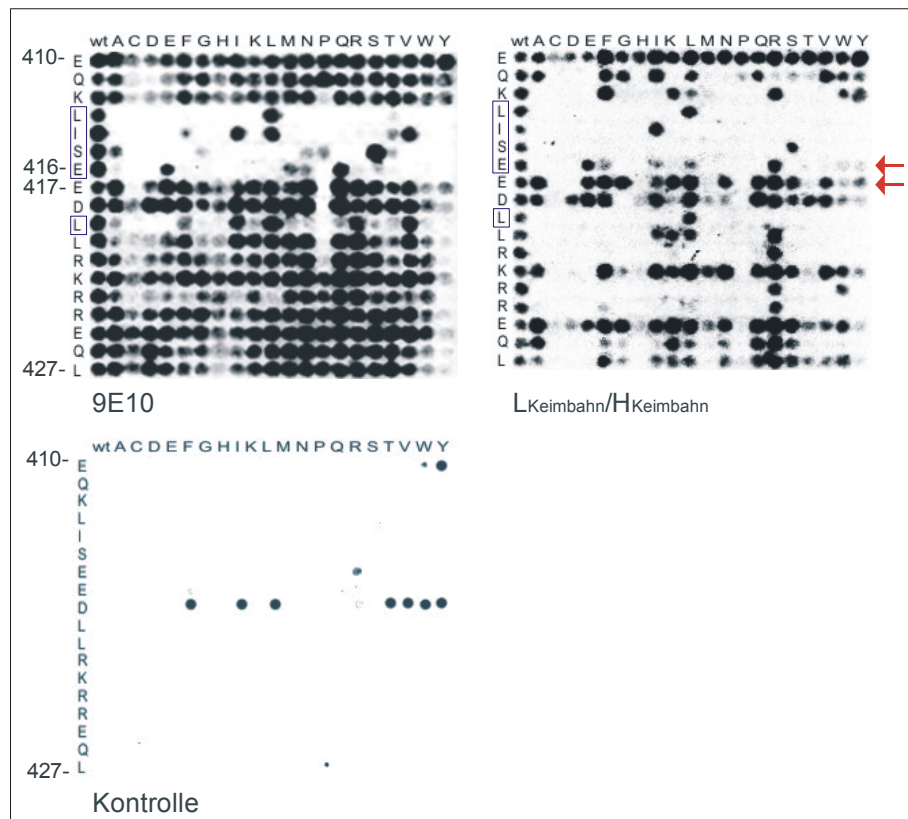


Abb.6.27.: Substitutionsanalysen am c-myc(410-427)-Peptid mit 9E10-Fab sowie mit der Fab-Keimbahnrückmutante L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}. Die Kontrolle erfolgte mit dem Detektionsantikörper ohne 9E10-Fab (bzw. Rückmutante). Die Schlüsselpositionen sind eingerahmt und die Pfeile deuten auf Änderungen in der Selektivität.

Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Schlüsselpositionen LISXXL im Peptid von L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} mit hoher Selektivität erkannt werden. Die selektive Erkennung der

Schlüsselposition E^{P416} geht jedoch teilweise verloren. Neben dem Originalpeptid werden auch Peptide mit den Austauschen R, F, W, Y sowie den aliphatischen Resten I und L gebunden. Es sollte aber nicht unerwähnt bleiben, dass auch der Nachweisantikörper an ein Peptid mit einem R an der Position 416 bindet, wenn auch weitaus schwächer. Mit Reifung des Antikörpers werden an dieser Position dagegen nur Q, A, N oder M toleriert (Abb. 6.28.). Es konnten somit Selektivitätsänderungen zu der Schlüsselposition E^{P416} während der Reifung des Antikörpers deutlicher nachgewiesen werden.

In der Kontrolle bindet der Nachweisantikörper myc-Peptide mit Austauschen an den Positionen 410 (Y), 416 (R) und 418 (F, I, L, T, V, W und Y), daher wurden diese aus der Auswertung ausgeschlossen.

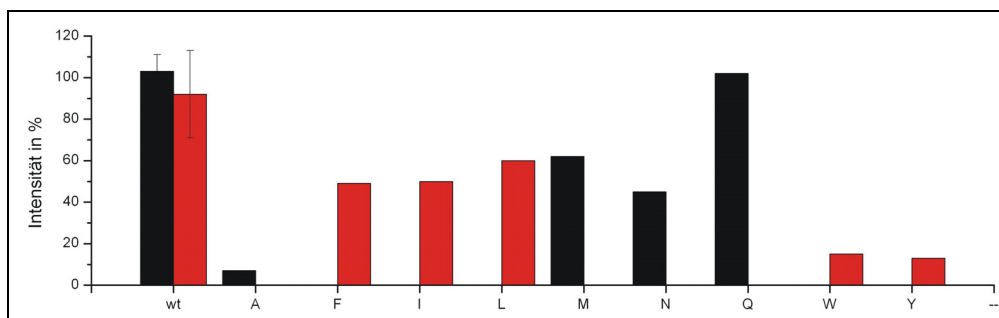


Abb. 6.28. : **Graphische Darstellung der Unterschiede in der selektiven Erkennung der Schlüsselposition E^{P416} im 18-mer c-myc(410-427)-Peptid zwischen dem 9E10-Fab (schwarz) und der Rückmutante L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn} (rot).** Gezeigt wird die Bindung an ausgewählte an der Position 417 gegen A, F, I, L, M, N, Q, W und Y substituierte Peptide. Die Bindung an das Wildtyppeptid in der selben Substitutionsreihe dient dem Vergleich.

Trotz der schwächeren Wechselwirkungen zwischen der 9E10-Keimbahngenrückmutante und dem 18-mer Peptid im Vergleich zum 9E10 werden die Reste G, I, L, S und V an der Position E^{P417} im Peptid stärker toleriert. Die erhöhte Toleranz zu diesen Resten ist auf die rückmutierte V_H-Domäne zurückzuführen und wurde in den Substitutionsanalysen am 8-mer, 11-mer myc-tag- und dem 20-mer Peptid gezeigt.

Reproduzierbarkeit der Signale in den Substitutionsanalysen

Die Reproduzierbarkeit der Signale in den Substitutionsanalysen wurde am Beispiel des Fab $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ untersucht, wozu das periplasmatisch lösliche und das *in vitro* gefaltete Fab in der Bindung an das myc-tag-Peptid in den Substitutionsanalysen unter Einbezug unterschiedlicher Detektionszeiten der Bindungssignale verglichen wurde. Der Vergleich der Bindungsspezifität zwischen dem *in vivo* und *in vitro* gefalteten Fab sollte Auskunft über den Einfluss der Rückfaltung geben. Diese Charakterisierung wurde vorgenommen, da die analysierten Fab-Fragmente der Konstrukte $H_{\text{Keimbahn}}/L_{9E10}$ und $H_{\text{Keimbahn}}/L_{\text{Keimbahn}}$ ausschließlich aus *in vitro* Faltungsexperimenten gewonnen wurden. Zur Einschätzung der Qualität der Peptidspotsynthese wurden Membranen aus zwei verschiedenen Synthesen verglichen. Von den *in vitro* gefalteten Konstrukten wurden jeweils 130 μg Protein in den Substitutionsanalysen eingesetzt. Die getestete Proteinmenge an periplasmatisch löslichen $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ betrug 20 μg . Die Detektionszeiten für das Bindungssignal variierten von 5 sec über 2 min bis zu 10 min (Abb. 6.29.).

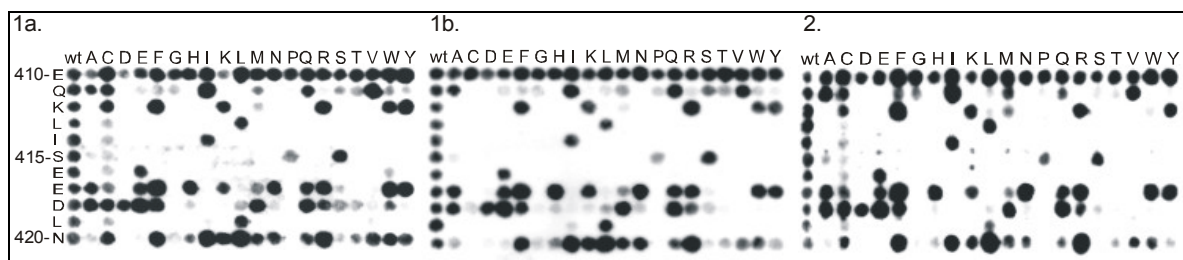


Abb. 6.29.: **Reproduzierbarkeit der Bindung von $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ an das myc-tag-Peptid in den Substitutionsanalysen.** (1) Membran aus einer myc-Peptidspotsynthese getestet mit dem (a.) *in vitro* rückgefalteten Fab (130 μg) und dem (b.) periplasmatisch löslichen Fab (20 μg). Das Bindungssignal wurde 2 min (a.) und 5 sec (b.) lang detektiert. (2.) Bindung des *in vitro* rückgefalteten Fab (130 μg) an eine Membran aus einer anderen myc-Peptidspotsynthesecharge. Das Bindungssignal wurde 10 min lang detektiert.

Die Ergebnisse an diesem Beispiel zeigen, dass weder die Rückfaltung der Fab-Fragmente noch die Charge, aus der die synthetisierten Peptidspots auf der Membran stammen, einen Einfluss auf die Bindungssignale in den Substitutionsanalysen nehmen. Es zeigt sich lediglich, dass das rückgefaltete Fab unspezifisch an Peptide mit Cysteinsubstituenten bindet (Abb. 6.29.). Auch die Analysen zu unterschiedlichen Signaldetektionszeiten und

Proteinmengen verdeutlichen, dass jene keinen signifikanten Einfluss auf das Substitutionsmuster haben. Die Intensität der einzelnen Bindungssignale in den Substitutionsanalysen konnte mit dem Programm ImageJ ermittelt werden und verdeutlicht in einer graphischen Darstellung die gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Signale (Abb. 6.30). Hieraus lies sich für die dreifache Bestimmung der Signalintensität an jedem Peptidspot eine mittlere Standardabweichung von 15 % errechnen. Die folgende Abbildung 6.30. zeigt die in Prozent ausgedrückten Bindungssignale der Fabs an die substituierten Peptide in Relation zum gemittelten Bindungssignal an das Wildtypepeptid (100%) auf der jeweiligen Membran.

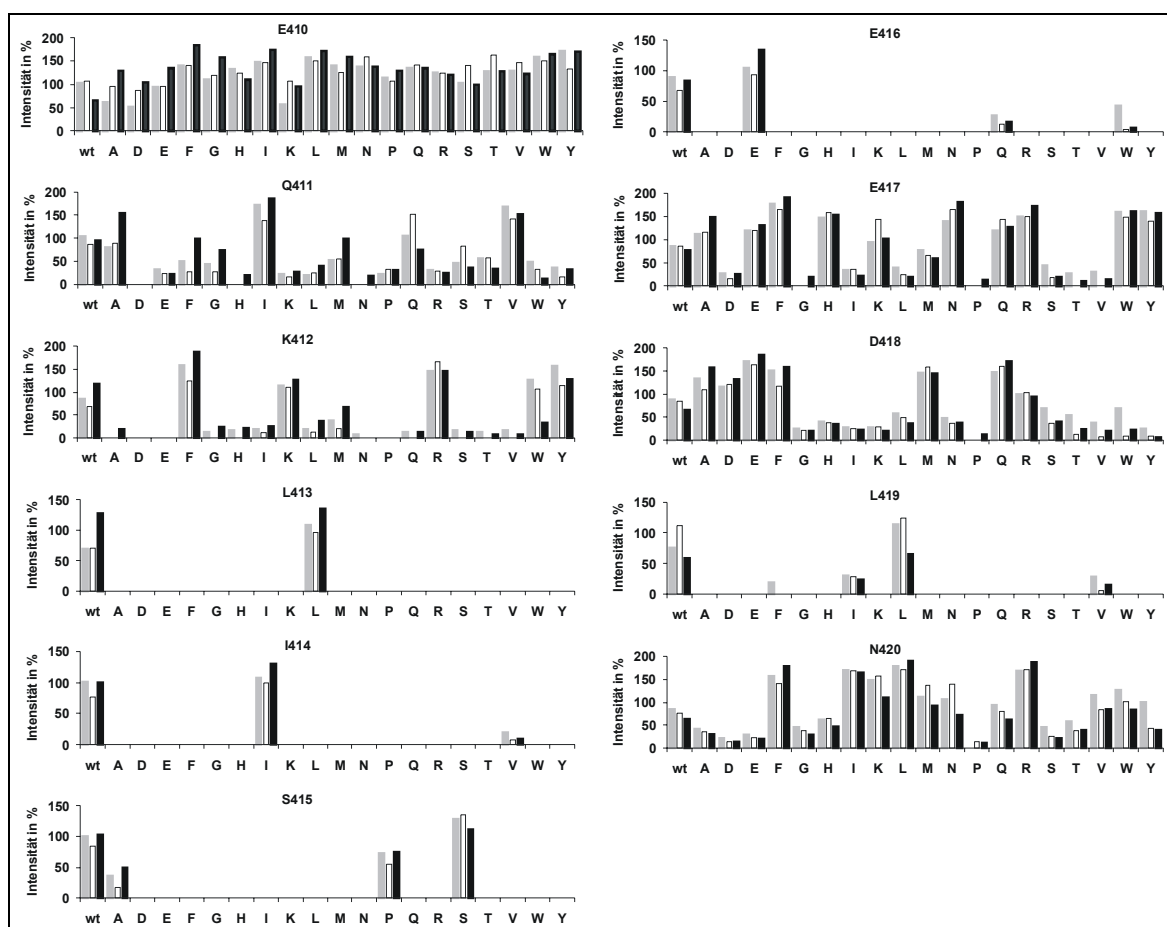


Abb. 6.30. : Graphische Darstellung der Reproduzierbarkeit der Intensitäten der Bindung von periplasmatisch löslichen und *in vitro* rückgefalteten Fab L_{Keimbahn}/H_{9E10} an das myc-tag-Peptid in den Substitutionsanalysen. Gezeigt wird die Bindung vom *in vitro* rückgefalteten Fab (grau) und periplasmatisch löslichen Fab (weiß) an myc-tag-Peptide auf einer Membran aus der selben Synthese und vom *in vitro* rückgefalteten Fab (schwarz) an myc-tag-Peptide aus einer unabhängigen Synthese.

Die Schwankungen in den Intensitäten der Bindung in diesen drei Vergleichsexperimenten mit dem Fab $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ sind geringfügig und in der Gesamtheit zeigt sich das selbe Substitutionsmuster. Die Bindung an das Peptid mit dem Austausch W an der Position 412 ist im Gegensatz zu den beiden übrigen Membranen (1a. und 1b. Abb. 6.29.) auf der Membran 2. (Abb. 6.29.) nicht nachzuweisen und ist einziger deutlicher Unterschied.

6.6.2.2 Längenanalysen am c-myc-Peptid

Mit Hilfe von Peptidspotmembranen wurde der Einfluss der Peptidlänge auf die Affinität des Antikörpers untersucht. Hierfür wurde das myc-Peptid schrittweise am C- und N-Terminus, ausgehend von dem 11-mer $E^{410}QKLISEEDLL^{420}$, um eine Aminosäure auf das 20-mer $A^{408}EEQKLISEEDLLRKRRREQ^{427}$ verlängert.

Die Verlängerung des 11-mer Peptides um sieben Aminosäuren am C-Terminus erhöht die Affinität zum 9E10-Fab und zu den Fab-Keimbahnrückmutanten $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$, $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ und $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ (Abb. 6.31.). Die Affinität der Fabs 9E10, $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ und $L_{9E10}/H_{\text{Keimbahn}}$ zum Peptid nimmt mit einer Verlängerung des Peptides um die vier Aminosäuren LRKR zu. Längere Peptide werden dagegen nicht mehr mit einer signifikant höheren Affinität gebunden. Bei der Bindung von $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ an das substituierte Peptid ($E^{P409}F$) wird dagegen erst nach einer Verlängerung um die fünf Aminosäuren LRKRR kein deutlicher Affinitätsgewinn mehr verzeichnet. Die N-terminale Verlängerung um zwei Aminosäuren bringt dagegen keine Affinitätserhöhung. Im Falle der Bindung von $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ an das Peptid konnte sogar ein starker Verlust der Affinität nachgewiesen werden. Hier war auch ein längerer C-Terminus vom Vorteil für die Affinität der Bindung. Bei der Verlängerung des C-Terminus um die Aminosäuren LRKRREQ konnte noch eine Affinitätszunahme beobachtet werden. Wird am N-Terminus des Peptides ein E gegen F an der Position 409 ausgetauscht (siehe auch Abb. 6.20.) erhöht sich die Affinität des Antikörpers zum Peptid. Insbesondere bei der Bindung an das $L_{\text{Keimbahn}}/H_{\text{Keimbahn}}$ -Fab wird der durch diesen Austausch bedingte Affinitätsgewinn deutlich. Wahrscheinlich ist mit dem Austausch $E^{P409}F$ im Peptid ein zusätzlicher Kontakt des Peptides zum Antikörper generiert worden. Diese Daten zeigen, dass nur eine C-terminale Verlängerung des Peptides die Affinität zum Antikörper erhöht und essentiell für die detektierbare Bindung des 9E10-Keimbahnvorläufers an das myc-Peptid ist.

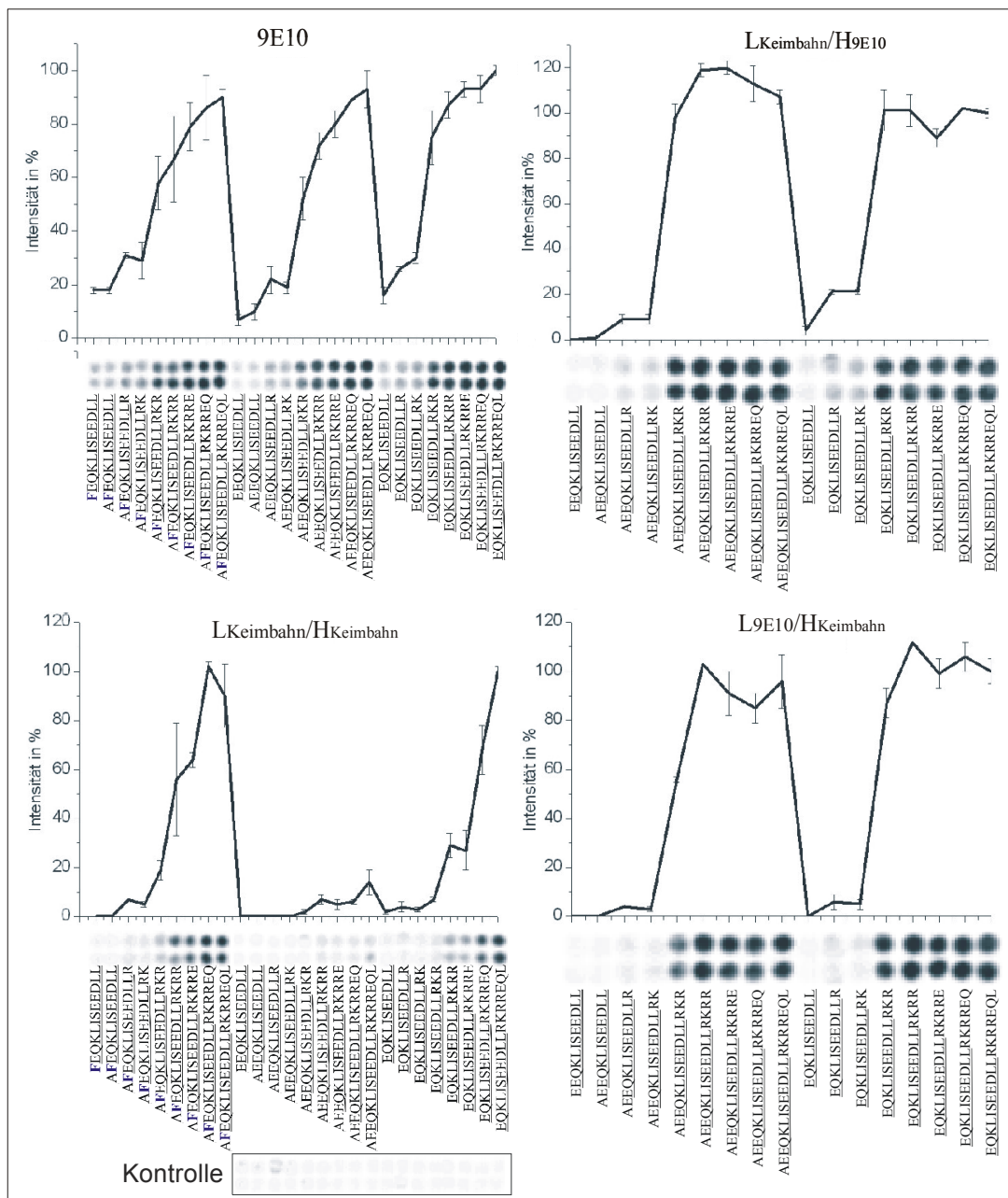


Abb. 6.31.: **Längenanalysen am c-myc-Peptid.** Gezeigt wird auf den Peptidspotmembranen der Einfluss der Peptidlänge auf die Affinität des 9E10-Fab und der Fab-Keimbahnrückmutanten LKeimbahn/H9E10, L9E10/HKeimbahn und LKeimbahn/HKeimbahn. Die Spots zeigen Peptide, die jeweils um eine Aminosäure, ausgehend von der Sequenz EQKLISEEDLL, auf AE(F⁴⁰⁹)EQKLISEEDLLRKRREQL und EQKLISEEDLLRKRREQL verlängert wurden. Die relativen Intensitäten der Bindung der Peptide sind im prozentualen Verhältnis zum 18-mer Peptid (=100%) dargestellt. Das Kontrolllexperiment zeigt den Detektionsantikörper ohne 9E10-Fab (bzw. Rückmutanten). Detektiert wurde bis zur Sättigung des intensivsten Signals.

6.6.2.3 Kreuzreaktivitätsanalysen mit homologen myc-Peptiden

In der Literatur wird von der Kreuzreaktivität des 9E10 zum murinen c-Myc-Protein berichtet (Siegel et al., 1998). Mit Hilfe der Peptidspotmembranen soll hier die Änderungen in der Spezifität des 9E10-Antikörpers während des Reifungsprozesses an drei synthetischen Peptiden, die eine sequenzielle Homologie (Tabelle 6.32.) zum humanen c-myc-Peptid aufweisen, gezeigt werden. Die Peptide wurden in Anlehnung an die Sequenz der Region 408-427 der c-Myc-Proteine aus der Maus und dem Huhn sowie des viralen v-Myc-Proteins, das im proviralen Genom des Vogelvirus MC29 kodiert wird, ausgewählt (Evan et al. 1985). Die Bindung des 9E10-IgG an diese Myc-Proteine wurde bereits von Evan et al. beschrieben, wobei keine Bindung des 9E10 an diese Proteine nachgewiesen werden konnte. Die Sequenz des murinen c-myc(K⁴¹⁷E)-Peptides entstammte, bis auf den Rest 417 der Sequenz des c-Myc-Proteins, aus der Maus. Dieses Peptid weist eine hohe verwandtschaftliche Beziehung zum humanen c-myc-Peptid auf und unterscheidet sich von jenem nur am N-Terminus.

Tabelle 6.32.: **Sequenzen der untersuchten myc-Peptide.** Die Schlüsselpositionen im humanen c-myc-Peptid sind unterstrichen.

c-myc-Peptid (408-427), Mensch	AEEQKLISEEDLLRKRREQL
c-myc-Peptid (K ⁴¹⁷ E), Maus (c-myc-Peptid, Maus)	A <u>D</u> E <u>H</u> <u>K</u> <u>L</u> T SEEDLLRKRREQL (A <u>D</u> E <u>H</u> <u>K</u> <u>L</u> T S <u>E</u> <u>K</u> D LLRKRREQL)
v-myc-Peptid	S <u>D</u> E <u>H</u> <u>K</u> <u>L</u> I <u>A</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u> Q LRRRREQL
c-myc-Peptid, Huhn	S <u>D</u> E <u>H</u> <u>R</u> <u>L</u> I <u>A</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u> Q LRRRREQL

Das 9E10-Fab und seine V-Domänen-Keimbahnrückmutanten zeigen unterschiedliche Kreuzreaktivitäten zu den hier getesteten myc-Peptiden (Abb. 6.33.). Das gereifte 9E10-Fab kreuzreagiert mit einer schwachen Affinität mit dem murinen 20-mer c-myc(K⁴¹⁷E)-Peptid. Die Kreuzreaktivität bleibt auch bestehen, wenn die Gesamtaffinität zum Peptid durch die N-terminale Substitution E^{P409}F im murinen c-myc(K⁴¹⁷E)-Peptid erhöht wird. Es konnte keine Bindung des 9E10-Fab an die avianen und viralen 20-mer sowie 20-mer(E⁴⁰⁹F) c- bzw. v-myc-Peptide detektiert werden. Eine Bindung des Keimbahn-kodierten 9E10-Vorläufers an das murine 20-mer c-myc(K⁴¹⁷E)-Peptid ist nicht detektierbar (Abb. 6.33.).

7 Diskussion

7.1 Identifizierung der Keimbahngene zu 9E10

Schiweck et al. (1997) haben die Keimbahngensegmente zur 9E10 V_H-Region als DFL16.1 für das D-Gensegment und JH4 für das J-Gensegment identifiziert. Das V-Gensegment der schweren Kette ordneten sie der VH 7183-Genfamilie zu. In der vorliegenden Arbeit wird das V-Gensegment in der VH-Region zu VH 3:3.39 als Bestandteil der Genfamilie VH 7183 zugeordnet, das D- und J-Gensegment – zu DFL16.1 und JH4. Für die V_L-Region werden die Keimbahngensegmente VL21.2* und J1 identifiziert. Die Nukleotidsequenz an der V-D-Verknüpfungsstelle in der V_H-Region im nicht mutierten Antikörper konnte aufgrund von zufälligen Nukleotiddeletionen und -austauschen während des Rekombinationsvorgangs nicht bestimmt werden. Dies betrifft 7 Nukleotidpaare in der CDR-H3. Somatische Mutationen in dieser kurzen Sequenz können nicht ausgeschlossen werden. Das hier beschriebene L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}-Fab kann trotzdem mit hoher Wahrscheinlichkeit den kompletten 9E10-Keimbahnvorläufer repräsentieren. Die 9E10-Keimbahnrückmutanten erwiesen sich alle als funktionelle myc-Peptidbinder in den ELISA-, SPR- und Peptidspotanalysen. Die für 9E10 typische Erkennung der Peptidschlüsselreste LISE, die bereits von Hilpert et al. (2001) für 9E10 beschrieben worden ist, konnte auch für die Keimbahnrückmutanten des Antikörpers bestätigt werden. Damit konnte belegt werden, dass 9E10 aus den hier ermittelten Keimbahnensegmenten hervorgegangen ist.

Der affinitätsgereifte 9E10-Antikörper zeigt mit 20 somatischen Mutationen eine relative hohe Anzahl von Austauschen. Dieses ist jedoch für gereifte hochaffine Antikörper nicht ungewöhnlich, so z. B. reichern sich im hochaffinen anti-Lysozym-Antikörper H8 (K_D = 200 pM) insgesamt 24 somatische Mutationen an (Yili et al., 2003).

7.2 Bakterielle Expression von 9E10-Fab und Rückmutanten

Die erfolgreiche, wenn auch nur mit geringen Ausbeuten, periplasmatische Expression des 9E10-Fab und seiner Keimbahnrückmutante erfolgte aus dem mit einem tet-Promoter-Operator regulierten pASK85-Expressiosvektor in dem *E. coli*-XL-1-Zellstamm. Für das lösliche *E. coli*-Periplasma sind in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE in der Doppelbande bei 46 kD die murine κ -Immunglobulindomäne und der His-tag nachweisbar, wobei allerdings nur die obere Bande als Fab (ca. 50 kD) identifiziert werden konnte. Dieses Expressionsmuster des 9E10-Fab ist mit dem der Rückmutanten, mit Ausnahme der Rückmutante H^{H31}S, identisch. Warum die Einzelmückmutation H^{H31}S im 9E10-Fab zu einem anderen Expressionsmuster führt, wurde nicht untersucht. Hier soll nur angedeutet werden, dass die von U. Griebel (2005) konstruierte 9E10-Variante im pASK85 (Klon 4) ebenfalls ein anderes Expressionsmuster zu dem 9E10-Fab in *E. coli* aufweist. Der 9E10-Klon 4 zeigt sechs Primer bedingte Substitutionen an den Termini der variablen Regionen: H^{H3}K, V^{H5}Q, A^{H107}T, S^{H108}T, V^{L3}E und I^{L106}L. Im Falle von 9E10-Fab Klon 4 und von 9E10-Fab mit der Rückmutation H^{H31}S dominiert die obere Bande (Fab) der Doppelbande bei 46 kD in der nicht reduzierenden SDS-PAGE, was ebenfalls ein Hinweis auf eine bessere Fab-Produktion in *E. coli* ist. Ob die Einzelmückmutation H^{H31}S und die Substitutionen im 9E10-Klon 4 einen Einfluss auf den kotranslationalen Transport der Ketten über den Sec-Weg durch die innere Membran der Zelle haben oder ob sie die Löslichkeit der schweren Kette beeinflussen, bleibt vorerst ungeklärt. Zum Beispiel konnten Demarest et al. (2006) durch Austausche in der Aminosäuresequenz (primär im Fv) eines anti-Tetanus-Fab-Fragmentes die Expressionsausbeute des Fabs in *E. coli* steigern. Den Autoren zufolge können bestimmte Austausche in der Aminosäuresequenz die intrinsische Stabilität der Fab-Fragmente erhöhen, die wiederum eine korrekte Faltung des Proteins begünstigt. Auch Tuckey und Noren (2002) haben mit Einzelaminosäureaustauschen in der V_L-Domäne im Fab die Expression von Fab steigern können.

Neben der Aminosäuresequenz hat auch die Temperatur einen Einfluss auf die lösliche periplasmatische Expression der 9E10-Fab-Fragmente in *E. coli*. Die Assemblierung der leichten und schweren Kette ist von der Inkubationstemperatur der Zellen während der Kultivierung vor der Induktion der Expression des Fab abhängig. So erhöht die Kultivierung der Zellen bei einer geringen Temperatur (22°C) die Ausbeute an funktionellem Fab, während

sie bei 37°C abnimmt. Eine Erklärung hierfür könnten die Experimente von Vanhove et al. liefern. In Säugerzellen assoziieren neu synthetisierte schwere und leichte Ketten sofort mit dem BIP-Chaperon (BIP = *binding protein*) (Knittler und Haas, 1992; Vanhove et al., 2001). Bei der schweren Kette bindet BIP an hydrophobe Bereiche der C_H1-Domäne, verhindert somit die Aggregation und unterstützt die Assemblierung mit der leichten Kette. In Abwesenheit der leichten Ketten bleiben die schweren Ketten mit den BIPs assoziiert. Diese Bindung an BIP ist wichtig, sie stellt sicher, dass die schweren Ketten die Zelle nicht ohne die leichte Kette verlassen oder aggregieren können. Die Autoren haben gezeigt, dass bei einer Freisetzung der schweren Kette aus dem Komplex mit BIP bei 22°C der größte Teil faltet, während bei 37°C der größte Teil aggregiert. BIP konnte außerdem in Hefen und Pflanzen gefunden werden, jedoch nicht in Bakterien, was auch erklären könnte, weshalb in *E. coli* bei 37°C kaum 9E10-Fabs entstehen und der größte Teil der schweren Kette als *inclusion bodies* vorliegt. Die Temperatur des Mediums im Schüttelkolben der zuvor bei 37°C kultivierten Zellen war zu Anfang der Expression wahrscheinlich höher als die Temperatur von 22°C im Inkubatorschrank während der Expression.

Schiweck et al. (1999) beschreiben in ihrer Arbeit die löslich exprimierte individuelle 9E10 V_H-Domäne in *E. coli*. Dies ist ungewöhnlich, denn normalerweise lassen sich einzelne Antikörper V_H-Domänen aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur schwer produzieren. Die Autoren erklären die Löslichkeit der 9E10-V_H-Domäne mit einem Vergleich mit V_{HH}-Domänen der Schwereketten-Antikörper. Eine hydrophobe Oberflächenregion der V_H-Domäne, nämlich die, die die Interaktionsfläche mit der V_L-Domäne darstellt, führt normalerweise zu Aggregation, wenn die V_L-Domäne fehlt. In den V_{HH}-Domänen der Schwereketten-Antikörper sind einige hydrophobe Resten dieser Region durch hydrophile ersetzt worden. Zudem können sehr lange CDR-H3 restliche hydrophobe Bereiche dieser Interaktionsfläche durch Bindung vom Wasser abschirmen und somit die Löslichkeit der V_{HH}-Domäne erhöhen. Schiweck et al. vermuten, dass die gute Löslichkeit der 9E10-V_H-Domäne durch Bindung der sehr langen und hydrophoben CDR-H3 an die hydrophobe Interaktionsfläche der 9E10-V_H-Domäne zustande kommt. In der hier vorgestellten Arbeit wird gezeigt, dass die in *E. coli* periplasmatisch produzierte schwere Kette V_H-C_H1 (inklusive His-Tag) als lösliche monomere Kette, assoziiert mit der leichten Kette (Fab) und in unlöslicher Form als *inclusion bodies* (Einschlusskörper) vorliegt, wobei die Aggregation zu *inclusion bodies* dominiert. Es kommt also auch zur Synthese löslicher monomerer schwerer Ketten in *E. coli*, möglicherweise trägt die lange und hydrophobe CDR-H3 auch hier mit zur Löslichkeit der V_H-C_H1-Kette bei. Wie von Schiweck et al. (1997) vorgeschlagen, können

Kristallstrukturanalysen einer einzelnen V_H-Domäne Information über die Konformation der CDR-H3 (Maskierung der Interaktionsfläche mit der V_L-Domäne) liefern.

Die leichte Kette liegt im Periplasma vorrangig in löslicher Form vor. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE ist in der unteren der 46 kD-Doppelbande die leichte Kette detektierbar, die schwere Kette jedoch nicht (kein Nachweis des fusionierten His-tags). Diese Bande hat ein kleineres Molekulargewicht als die identifizierte Fab-Bande (> 46 kD, obere Bande). Es könnten Dimere der leichten Kette sein, vergleichbar mit Bence-Jones ähnlichen Dimeren (Stevens et al., 1991).

Die in den folgenden Kapiteln geführte Diskussion zu den Bindungseigenschaften des 9E10-Fab und seiner Rückmutanten erfolgt unter Einbeziehung der kristallographischen Daten der dimerisierten 9E10-Fab-Fragmente, von denen ein Fab das myc-tag-Peptid bindet (Krauß et al., 2007).

7.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von 9E10-Fab

9E10 wurde bereits von Hilpert et al., Schiweck et al. und Krauß et al. ausführlich in seiner Bindungsstärke zu dem 11-mer myc-tag-Peptid (EQKLISEEDLN) charakterisiert. Das 9E10-IgG bindet an den myc-tag in Fusion mit einem scFv-Fragment im kompetitiven ELISA mit K_D von 560 ± 190 nM (Hilpert et al., 2001). In Fluoreszenz-Titrationsexperimenten wird ein K_D für einen Komplex aus einem N-terminal mit einem Fluorophor markierten myc-tag-Peptid und einem in *E. coli* produzierten 9E10-Fab mit 80 ± 5 nM bestimmt (Schiweck et al., 1997). Auch von Krauß et al. (2007) wurde mit der isothermen Titrationskalorimetrie eine Bindungskonstante für das 9E10-IgG an das myc-tag-Peptid (K_D = 8.7 x 10⁻⁷M) ermittelt, die gut mit dem Wert im ELISA von Hilpert et al. (2001) übereinstimmt. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte für den K_D der Bindung des myc-tag-Peptides an das vom IgG proteolytisch abgespaltene 9E10-Fab, die in einem kompetitiven ELISA und mit der SPR-Methode (620 ± 350 nM, ELISA und 902 ± 1 nM, SPR) erhalten wurden, unterscheiden sich nicht signifikant von dem von Hilpert et al. (2001) und Krauß et al. (2007) publizierten Werten. Der in der vorliegenden Arbeit zusätzlich über Signalsättigungsexperimente mit der SPR-Methode gefundene K_D-Wert von 830 nM bestätigt dieses Ergebnis noch einmal. Im selben Signalsättigungsexperiment ergab der Quotient der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off}

($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) ebenfalls einen von den Literaturdaten nicht signifikant abweichenden Wert von 814 ± 141 nM. Die größeren Differenzen (bis Faktor 1,6) zwischen den Werten aus den ELISA und SPR-Messungen sind mit den unterschiedlichen Meßmethoden zu erklären. Bei der Bindung an Peptide können strukturelle Anpassungen für einen besseren Fit des Peptides an den Antikörper kritisch sein, somit sollte im Falle eines Ein-Schritt-Bindungsmechanismus die Gleichgewichtskonstante K_D gleich $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ sein. Größere Abweichungen von K_D zu $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ würden einen komplexeren Bindungsmechanismus wiedergeben, der die Folge von größeren Konformationsänderungen während der Komplexbildung sein könnte. Die Bindung des 9E10-Fab an das 11-mer myc-tag-Peptid wird deshalb nach dem Ein-Schritt-Mechanismus beschreiben, da hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Verhältnis $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ und K_D auftreten.

Für das rekombinant hergestellte 9E10-Fab haben sich keine signifikanten Unterschiede (bis Faktor 1,6) im K_D der Komplexbildung mit dem myc-tag-Peptid aus den ELISA- (500 ± 200 nM) und den SPR-Messungen (800 ± 100 nM) ergeben.

Da der K_D des vom 9E10-IgG proteolytisch abgespaltenen Fab und des rekombinanten 9E10-Fab-Fragmentes keine großen Unterschiede zeigen (bis Faktor 1,2), kann geschlussfolgert werden, dass die im Weiteren beschriebenen größeren Abweichungen im K_D der rekombinant produzierten 9E10-Rückmutanten durch die jeweilige(n) Rückmutation(en) zustande gekommen sein sollten. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass es sich bei dem rekombinant exprimierten 9E10 Fab um ein funktionelles Fragment handelt.

Der niedrigere K_D von 80 nM bei der Bindung des myc-tag-Peptides an das rekombinante 9E10-Fab, der von Schiweck et al. mit Hilfe der Fluoreszenztitration ermittelt wurde und eine Abweichung um den Faktor 7,8 (ELISA) und 11,3 (SPR) zu den hier gemessenen Werten aufweist, könnte durch zusätzliche Interaktionen des N-terminalen Fluorophors (Abz, 2-Aminobenzoesäure) am Peptid mit aromatischen Seitenresten der CDR-H3 bei der Bindung an den 9E10 erklärt werden. Kristallstrukturdaten des 9E10 im Komplex mit dem myc-tag-Peptid belegen eine direkte räumliche Nachbarschaft des N-Terminus des Peptides zu den Tyrosinresten 99, 100 und 100a der CDR-H3 (siehe auch Abb. 7.1.).

Hilpert et al. untersuchten weiterhin die Bindungsstärke des 9E10 zu verkürzten und mutierten myc-Peptiden. Das kürzeste vom 9E10 gebundene myc-Peptid war ein 8-mer (KLISEEDL) mit K_D von 26 ± 19 μ M. In der vorliegenden Arbeit wird 9E10 zum ersten Mal in seinem Bindungsverhalten zu einem längeren c-myc-Peptid untersucht. Ausgehend von einer Modellvorstellung, die auf der Kristallstrukturanalyse des 9E10 im Komplex mit dem

myc-tag-Peptid basiert, wird das Peptid am C-Terminus um sieben Aminosäuren und am N-Terminus um zwei Aminosäuren auf das 20-mer A⁴⁰⁸EEQKLISEEDLLRKRREQL⁴²⁷ verlängert. Mit zwei Meßmethoden konnte gezeigt werden, dass zum 20-mer myc-Peptid eine höhere Affinität als zum 11-mer myc-tag-Peptid besteht. Ein K_D von $6,8 \pm 1,6$ nM (kompetitiver ELISA) und ein K_D von $1,2 \pm 0,3$ nM (SPR) wurden für die Bindung des 9E10-Fab an das 20-mer-Peptid bestimmt. In der Literatur findet man anti-Peptid-Antikörper, wie den 164-2-Antikörper, der mit der höchsten Affinität ($K_D = 7,5$ nM) das kürzeste analysierte Peptid (11-mer) bindet, das zur Region (273-283) der *E. coli*-Tryptophan-Synthase gehört (Larvor et al., 1991). Dafür untersuchten Larvor et al. Peptide in einer Länge von 11 bis 29 Aminosäuren, um das Epitop des 164-2 Antikörpers präziser darzustellen. 9E10 dagegen erreicht eine höhere Affinität zu einem längeren myc-Peptid als zu dem in der Literatur beschriebenen myc-tag-Peptid. In den meisten Fällen jedoch, wie z. B. bei dem anti-Peptid-Antikörper CB4-1 (Kramer et al., 1997), bringen Verlängerungen am Peptid weder Verbesserung noch Verschlechterung in der Affinität.

Substitutionsanalysen am 20-mer Peptid zeigen einen Bereich, bestehend aus den Aminosäuren Q⁴¹¹KLISEEDLLRKR⁴²³, der mit einer höheren Selektivität erkannt wird. Die in der Literatur beschriebenen Schlüsselpositionen im Peptid LISE (Hilpert et al., 2001) werden in der vorliegenden Arbeit um den Rest L^{P419} auf die Schlüsselpositionen L⁴¹³ISEXXL⁴¹⁹ erweitert. Insbesondere in den Substitutionsanalysen am verlängerten 20-mer(408-427)-Peptid wird die sehr hohe Selektivität des 9E10 für den Seitenrest L^{P419} im Peptid klarer.

Längenanalysen mit Peptid-Spots haben gezeigt, dass die Verlängerung des C-Terminus um sieben Aminosäuren, ausgehend vom 11-mer-Peptid EQKLISEEDLL, zu einer Affinitätszunahme führt. Die Verlängerung des N-Terminus um A^{P408} und E^{P409} hingegen bringt einen Affinitätsverlust mit sich, Dieses wird besonders bei Bindungsexperimenten mit den Rückmutanten L_{Keimbahn}/H_{9E10} sowie L_{9E10}/H_{Keimbahn} deutlich und verstärkt sich in Bindungsexperimenten mit der kompletten 9E10-Rückmutante. Der Verlust der Affinität durch eine N-terminale Peptidverlängerungen kann durch Substitutionen am verlängerten N-Terminus verhindert werden, wie mit dem Austausch von E^{P409} gegen F in Längenanalysen und Substitutionsanalysen mit dem 20-mer Peptid gezeigt werden konnte. Bei der Bindung der kompletten 9E10-Rückmutante an dieses Peptid in den Peptidspot-Experimenten führt diese Mutation zu einem deutlichen Affinitätsgewinn im Vergleich zur Bindungsstärke an das 20-mer und 18-mer Peptid. Ein aromatischer Rest an Position 409 könnte mit den Tyrosinen 99, 100 oder 100a in der CDR-H3-Schleife interagieren (Abb. 7.1.), ähnlich wie bereits zuvor

im Zusammenhang mit dem niedrigen K_D (80 nM, Schiweck et al., 1997) des N-terminal mit einem Fluorophor markierten myc-tag-Peptides des Komplexes mit dem 9E10-Fab diskutiert wurde.

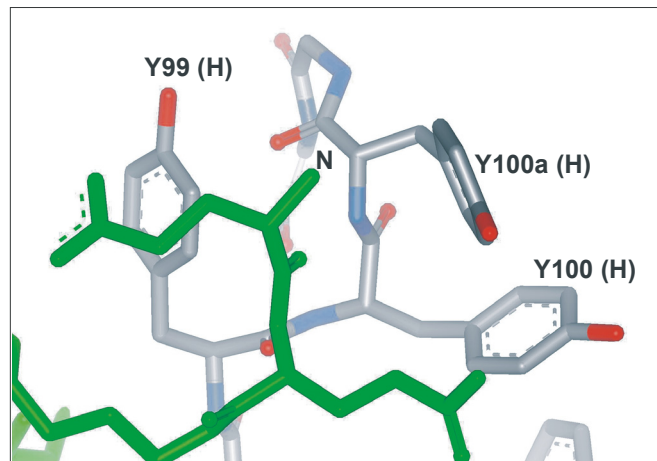


Abb. 7.1. : Der N-Terminus des myc-tag-Peptides (grün) ist von den Tyrosinresten 99, 100 und 100a in der CDR-H3-Schleife umgeben.

Der mit der C-terminalen Verlängerung einhergehende Affinitätsgewinn könnte auf die Ausbildung oder Fortsetzung einer Sekundärstruktur (z.B. einer α -Helix) im Peptid hindeuten. Am deutlichsten erkennt man den Einfluss der Peptidverlängerung bei der Bindung an die komplette 9E10-Rückmutante. Der um lediglich zwei Reste verlängerte N-Terminus führt zu einem Affinitätsverlust, während eine Verlängerung um sieben Reste am C-Terminus die Affinität erhöht. Der Affinitätsverlust, der bei der N-terminalen Verlängerung auftritt, könnte darauf hindeuten, dass es zu keinen spezifischen Interaktionen (außer z.B. bei der Substitution E⁴⁰⁹F) oder internen Stabilisierungen durch Sekundärstrukturbildung kommt. Anders verhält es sich im Falle des C-Terminus, was auf spezifische Interaktionen mit der 9E10 CDR-H3 oder eine Sekundärstrukturbildung im Peptid hinweisen könnte, die mit 11,2 bzw. 16,4 kJ/mol (ELISA, SPR) zu einem Affinitätsanstieg führen. Eine Erklärung könnte die in dieser Arbeit postulierte Modellstruktur der α -helikalen Bindungskonformation eines verlängerten C-Terminus liefern. Nach diesem Modell könnte insbesondere der Rest K^{P422} und möglicherweise auch Q^{P425} mit der CDR-H3 interagieren.

In den Bindungskinetiken äußert sich die höhere Affinität des 20-mer Peptides zum 9E10 verglichen mit dem 11-mer Peptid in einer anwachsenden Assoziationsgeschwindigkeit und

sinkenden Dissoziationsgeschwindigkeit. Eine schnellere Komplexbildung kommt in einem ca. 40-fachen Anstieg des k_{on} -Wertes zum Ausdruck. Die Komplexe zerfallen auch langsamer, was sich in einem ca. 20-fach abnehmenden k_{off} widerspiegelt, dass heißt also, die schnellere Assoziation der Komplexe leistet den größeren Beitrag zum Affinitätsgewinn. Da hier nur Änderungen am Peptid und nicht am Antikörper vorgenommen wurden und auch die N-terminalen Reste 408 und 409 des 20-mers keinen Beitrag zur stärkeren Bindung liefern, ist davon auszugehen, dass der verlängerte C-Terminus des Peptides eine entscheidende Rolle spielt. Im c-Myc-Protein ist die Sequenz des myc-Peptides Bestandteil einer langen α -Helix. Es wäre möglich, dass die myc-Peptide in Lösung und im immobilisierten Zustand ebenfalls zu einem Teil, wenn auch nur zu einem geringen, in einer α -helikalen Konformation vorliegen. So eine isolierte α -Helix wäre eine dynamische Struktur in Lösungen, die sich schnell faltet und entfaltet. In einem längeren Peptid könnte diese α -helikale Konformation mit einer höheren Wahrscheinlichkeit entstehen als in einem kürzeren, da sich mehrere für die Bildung einer α -Helix kritischen Nukleationspunkte bilden könnten (Creighton, 1993). Wäre für die Bindung des myc-Peptides an 9E10 am C-Terminus (415-427) des Peptides eine α -helikale Struktur energetisch günstig, könnte die Tendenz zur Ausbildung einer solchen Konformation im myc-Peptid die schnellere Assoziation des 9E10 an das 20-mer erklären.

Eine stabile α -Helix ist für die selektive Erkennung der Peptidschlüsselreste I^{P414} , S^{P415} und L^{P419} durch 9E10 entscheidend, da die Bindungstaschen dieser Peptidseitenketten teilweise von den Peptidresten des α -helikalen C-Terminus, wie in der Kristallstruktur des 9E10 mit dem myc-tag-Peptid ersichtlich, gebildet werden. Die für die selektive Erkennung wichtigen Umgebungen dieser Schlüsselreste kommen also nur im Falle einer α -helikalen Konformation des C-Terminus (ab Position 415) des Peptides zustande. Somit bestimmt die Konformation des myc-Peptides die Bindungsspezifität des 9E10 mit.

Die Bindung an das 20-mer Peptid, verbunden mit einer höheren Affinität, könnte den Bindungsmodus des Antikörpers an das als Immunogen eingesetzte längere Peptid(408-439) als Konjugat mit KLH (KLH = *keyhole limpet hemocyanin*), Evan et al., 1985) mimen. Das 20-mer Peptid könnte also eine Konformation ähnlich der des verwendeten Antigens annehmen. Es bleibt mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse oder NMR zu untersuchen, ob die Peptidreste 408-439 als Konjugat mit dem Protein KLH eine α -Helix ausbilden, welche Bindungskonformation das 20-mer-Peptid, insbesondere die C-terminalen Reste 415-427, bei der Bindung an 9E10 einnimmt und welche Bindungskonformation die CDR-H3 bildet (falls abweichend von der Bindung an das myc-tag-Peptid). Analog hierzu untersuchten Zahnd et al.

(2004) die Bindung des scFv H6 an ein 12-mer Peptid, dessen Sequenz Teil eines *coiled-coil* Leuzin-Zippers des Hefetranskriptionsfaktors GCN4 ist. In der Kristallstruktur war im Komplex mit dem H6 das Peptid deutlich als eine α -Helix mit drei Drehungen zu erkennen. Zahnd et al. vermuten, dass der Ursprung des Peptides (α -Helix) die Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix im Komplex mit dem H6 erklären könnte. Ihre CD-Analysen haben gezeigt, dass das Peptid in Lösung klar als ein *random coil* (Knäuelkonformation) vorliegt und die Ausbildung der α -Helix vom H6 induziert wird. Es wäre also auch interessant, CD-Spektren der verschiedenen myc-Peptide aufzunehmen, um eine Aussage über deren Konformation in Lösung machen zu können. Ein helikaler Konformationsbereich von an Antikörper gebundenen Peptiden ist ungewöhnlich und wurde bisher nur für zwei weitere Kristallstrukturen des Komplexes des C21 mit P-Glycoprotein, in dem alle 11-Peptidreste eine α -Helix ausbilden (van den Eisen et al., 1999), und des Komplexes des anti-Interleukin 2 Fab mit einem Nonapeptid mit sieben Resten in einer α -helikalen Konformation (Afonin et al., 2001) beschrieben.

Die Kinetik der Komplexassoziation zwischen 9E10 und dem 20-mer-myc-Peptid ist, verglichen mit vielen anderen Antikörpern, eine langsame bis mittelschnelle ($k_{on} = 0,99 \pm 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, myc(408-427)-Peptid). Die Komplexe sind jedoch sehr stabil und zerfallen nur langsam ($k_{off} = 0,12 \pm 0,03 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Mit einem k_{on} von $0,99 \pm 0,04 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zum myc(408-427)-Peptid bei 23°C ist 9E10 vergleichbar mit dem k_{on} anderer hochaffiner Antikörper wie dem anti-Hapten-Fab 9T10, das NP (4-Hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl mit einem $K_D = 8,3 \pm 0,2 \text{ nM}$ und einem $k_{on} = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Sagawa et al., 2003) bei 25°C bindet. Das simulierte Sensorgramm der Bindung dreier Moleküle an ihren Bindungspartner in einer Standard-SPR in der Abbildung 7.2. (nach Andersson, 2004) soll zeigen, dass eine gleich hohe nM-Affinität durch unterschiedliche Bindungskinetiken erreicht werden kann. Der 9E10 folgt dem Beispiel A. Die hohe Affinität zum Peptid wird vorrangig durch den langsamen Zerfall der Komplexe, ausgedrückt durch die langsame Dissoziation, erreicht. Die im Peptid teils vorhandene Flexibilität sowie die partiell flexible Bindungstasche des 9E10 könnten der Grund für die mittelschnelle Assoziation der Komplexe sein. In der Kristallstruktur des freien 9E10-Fab (Krauß et al., 2007) ist keine definierte Elektronendichte für die Loop-Regionen der CDR-H3 und Teile der CDR-L1 auszumachen. In der Komplexstruktur des 9E10-Fab mit dem myc-tag-Peptid gibt es große Konformationsunterschiede in der CDR-H3-Schleife zwischen dem bindenden und dem nicht bindenden Fab, die im Kristall mit einer Stöchiometrie von zwei Fab auf ein Peptid vorliegen (Krauß et al., 2007). Die Kristallstrukturdaten deuten auf eine hohe Flexibilität der CDR-H3

hin, außerdem berichten Krauß et al. von einem ungünstigen Beitrag der Entropie zur freien Bindungsenergie. Die gebildeten Sekundärstrukturen des Peptides im Komplex (insbesondere das β -Faltblatt mit der 9E10-CDR-H3) sind möglicherweise einer der Gründe für die hohe Stabilität des Komplexes.

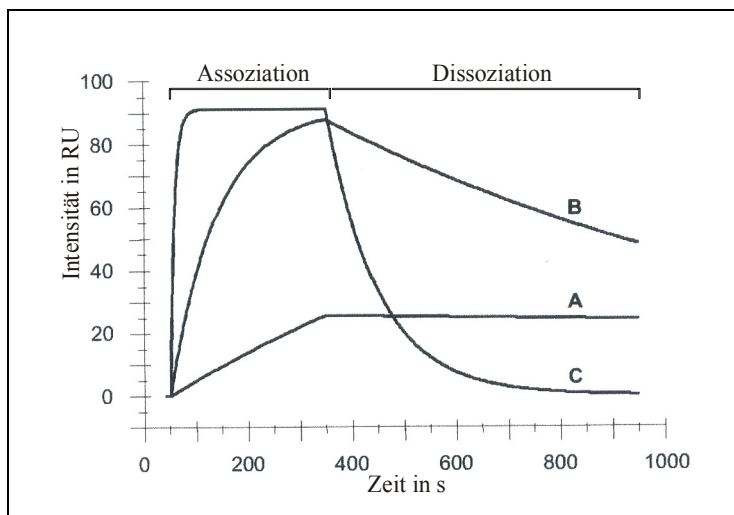


Abb.7.2. : **Simulierte SPR-Diagramme dreier Moleküle, die mit gleicher Affinität ($K_D = 10$ nM) jedoch mit unterschiedlichen kinetischen Parametern interagieren.** Das Diagramm A zeigt eine langsame Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit ($k_{on} = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Im Diagramm B sind mittelschnelle Kinetiken ($k_{on} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und im Diagramm C schnelle ($k_{on} = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) zu sehen (nach Andersson, 2004).

Einen weiteren wichtigen Hinweis für die mögliche Existenz einer C-terminalen α -Helix im Peptid liefern die Substitutionsanalysen an den verlängerten myc-Peptiden. Einfach substituierte Peptide mit Prolinen im Bereich 416-421 werden im Falle des 20-mers nicht gebunden. In der Kristallstrukturanalyse des 9E10 im Komplex mit dem myc-tag-Peptid bilden die Reste 415-420 eine α -helikale Struktur (Abb.7.3). In den Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid wird nur an der letzten Position (420) der α -helikalen Struktur ein P schwach toleriert. Im 20-mer-Peptid wird trotz hoher Gesamtaffinität ein P an Position 420 nicht toleriert. Erst ab der Position 422 werden Proline im 20-mer-Peptid zunächst schwach und zum C-Terminus hin stärker toleriert. Die Diskriminierung von Prolinresten am C-Terminus könnte auf eine α -helikale Struktur deuten. Auch wenn die Substitutionsanalysen keine Aussage über die Peptidrückgratkonformation geben, liefert das folgende Beispiel eine gute Übereinstimmung zwischen der Selektivität zum Prolinrest 415 im Peptid in den

Substitutionsanalysen und der Bindungskonformation des myc-tag-Peptides in der 9E10-Bindungsregion in der Kristallstruktur. Das Peptidrückgrat ändert nur an einem Punkt seine Richtung (Kristallstrukturdaten) – am Rest 415 (Abb.7.3). An der Schlüsselposition S^{P415} werden neben S auch die Substituenten P, A und G im myc-tag-Peptid toleriert. Ein P an dieser Position kann die für die Bindung des myc-Peptides notwendige Richtungsänderung erzwingen, ein G würde es dagegen erlauben. Prolinreste passen auch gut an den N-Terminus einer α -Helix (Creighton, 1993).

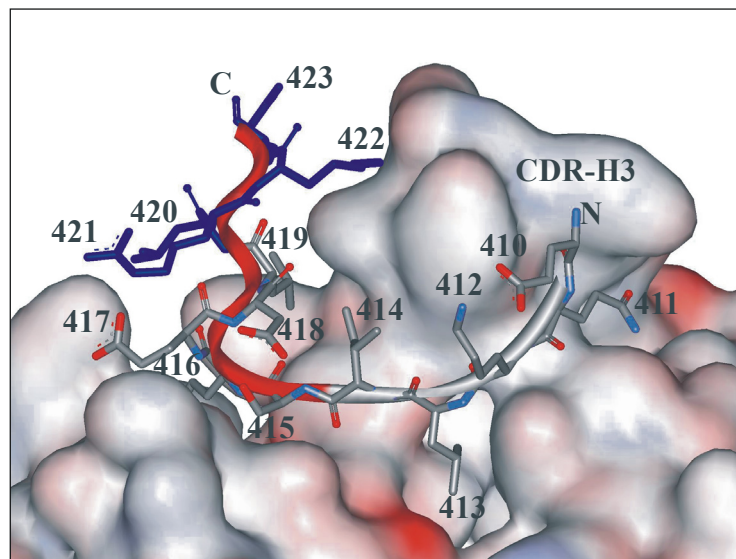


Abb.7.3: **Modellierte Bindung des verlängerten Epitops (E⁴¹⁰QKLISEEDLLRKR⁴²³) an den 9E10.** Die Aminosäuren 410-419 entsprechen der Konformation des Peptides im Komplex mit 9E10 aus der Kristallstrukturanalyse. Die Konformation der Aminosäuren 420-423 (blau) des Peptides ist modelliert. Vom 9E10-Antikörper ist die Lösungsmittel zugängliche Oberfläche dargestellt. In Rot wird die C-terminale α -Helix gezeigt.

Basierend auf den hier diskutierten Messdaten wird das in der Literatur beschriebene 9E10-Epitop E⁴¹⁰QKLISEEDL⁴¹⁹ um vier Aminosäurereste auf die Sequenz E⁴¹⁰QKLISEEDLLRKR⁴²³ verlängert. Die Bindung des verlängerten C-Terminus (420-424) an den 9E10 wird in einer α -helikalen Konformation vorgeschlagen (Abb. 7.3.). Die für die Bindung entscheidenden Schlüsselpositionen im Peptid werden um L^{P419} auf L⁴¹³ISEXXL⁴¹⁹ erweitert. Mit dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Modell der Bindung des verlängerten Peptides an den 9E10, das eine α -Helix am C-Terminus (420-424) des Peptides postuliert, kann die hohe Affinität an das verlängerte Peptid erklärt werden.

7.4 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Rückmutanten

7.4.1 Einfluss von Einzelrückmutationen auf die Bindungseigenschaft

7.4.1.1 Die Einzelrückmutationen $H^{H31}S$, $R^{H53}G$ und $G^{H52}S$

In der Kristallstruktur des 9E10 im Komplex mit dem myc-tag-Peptid befinden sich die Aminosäuren H^{H31} und R^{H53} im direkten Kontakt zu dem Peptid. Ein Histidin an der Position 31 der V_H -Domäne ist laut der R.U.Bi.C.-Datenbank selten. Einzelrückmutationen dieser Aminosäuren auf die Keimbahngensequenz haben nur einen geringen Einfluss auf den K_D der Bindung des Antikörpers zum Peptid. Die geringen Änderungen im K_D waren in den Bindungsexperimenten zum schwächer affinen myc-tag-Peptid besser messbar. So kam es mit der Rückmutation $R^{H53}G$ zum 8-fachen Affinitätsverlust des Antikörpers bei der Bindung an das myc-tag-Peptid in den ELISA- und zum 20-fachen Affinitätsverlust in den SPR-Experimenten. Die Einzelrückmutation $H^{H31}S$ ergab eine 2-fache (ELISA) bzw. 3-fache (SPR) Einbuße für die Affinität des Antikörpers. Im Vergleich hierzu brachte die Bestimmung des K_D bei der Bindung der 9E10-Rückmutante $R^{H53}G$ an das höher affine myc(408-427)-Peptid (ELISA) keine signifikanten Unterschiede zum K_D der Bindung des 9E10 an das Peptid, was wiederum den geringen Einfluss dieses Seitenrestes auf die Affinität des 9E10 unterstreicht. Die Mutagenese von Lösungsmittel-exponierten Aminosäuren kann laut Lo Conte et al. (1999) nur einen geringen Einfluss auf die Affinität ausüben. Die geringen Effekte der Einzelrückmutationen $H^{H31}S$ und $R^{H53}G$ auf die Affinität des Antikörpers könnten ebenfalls auf die Lösungsmittel-exponierte Lage dieser Positionen zurückgeführt werden.

Die Substitutionsanalysen mit myc-Peptiden unterschiedlicher Affinität zum Antikörper machten zudem eine feinere Analyse der Bindungsspezifität der Rückmutanten möglich. So konnte die Bindungsspezifität der 9E10-Rückmutante $H^{H31}S$ besser am verkürzten 8-mer c-myc(412-419)-Peptid und die der Rückmutante $R^{H53}G$ am längeren 11-mer myc-tag-Peptid charakterisiert werden. Wie aus diesen Substitutionsanalysen zu ersehen ist, nimmt die

selektive Erkennung von E^{P417} durch den Antikörper mit der Rückmutation dieser Reste ab. Die Abbildung 7.4. zeigt die räumliche Umgebung des Peptidseitenkettenrestes E^{P417} in der Kristallstruktur des 9E10 im Komplex mit dem myc-tag-Peptid. Die Position E^{P417} ist Bestandteil der kurzen C-terminalen α -Helix. Der Peptidrest E^{P417} wird von den Resten S^{H30} über eine Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül, von H^{H31} über Van-der-Waals-Kontakte und von R^{H53} über ionische Wechselwirkungen (3,08 Å Abstand) gebunden. In der Kristallstruktur des c-Myc-Proteins im Komplex mit dem Max-Protein (Nair et al., 2003) bildet der Proteinrest E⁴¹⁷ dagegen eine Salzbrücke mit dem Rest R⁴²¹ derselben α -Helix aus (2,8 Å-Entfernung). Allerdings bleibt unklar, welche Bindungskonstellation für den Peptidrest E^{P417} bei der Bindung des 9E10 an das verlängerte 20-mer Peptid vorliegt, wenn durch eine Verlängerung des Peptides der Rest R^{P421} hinzukommt.

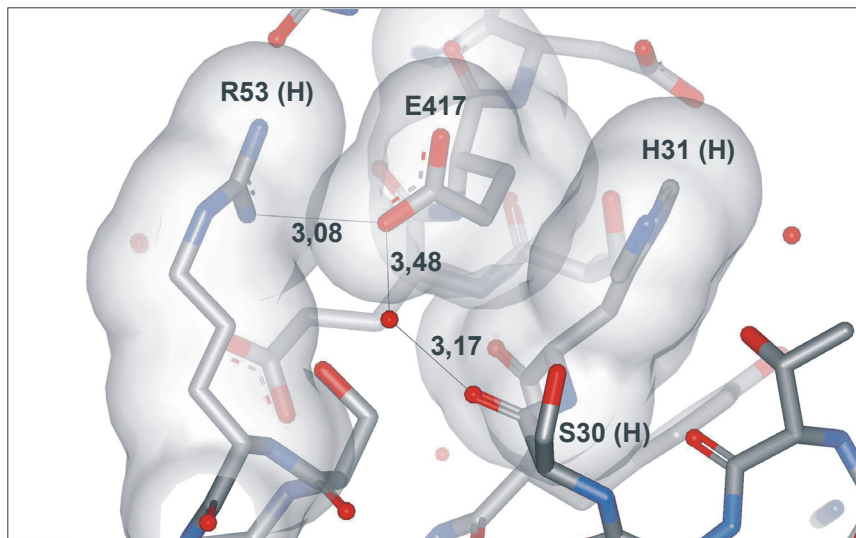


Abb. 7.4.: **Bindung des Peptidrestes E^{P417} durch die Reste H^{H31}, R^{H53} und S^{H30} im 9E10.** Die Abstände zwischen den Atomen sind in Å angegeben.

Die Substitutionsanalyse am verkürzten Peptid c-myc(412-419) mit der H^{H31}S Einzelmückmutation im 9E10 zeigt eine zunehmende Toleranz des Antikörpers gegenüber den Peptidresten G, L und M an Position 417. Jene substituierten Peptide werden von 9E10 H^{H31}S-Fab besser gebunden als vom 9E10. Dagegen wird das Peptid mit einem Y am Rest 417 von dieser Rückmutante schwächer gebunden als vom gereiften 9E10-Fab, da wahrscheinlich die günstigen Wechselwirkungen des Y mit dem H wegfallen. Auch die Rückmutation R^{H53}G im 9E10 begünstigt eine höhere Toleranz zu den Substitutionen L, M, S, T, und V am Rest 417

des Peptides. Mit den Einzelmückenmutationen von H^{H31} und R^{H53} zu S und G werden zwei positiv geladenen Reste in der Bindungstasche des Peptidrestes E^{P417} eliminiert. Apolare Aminosäurereste, wie I, L und V, an der Position 417 im Peptid können nun auch von dem rückmutierten Antikörper toleriert werden, wobei bereits eine dieser Rückmutationen (H^{H31} oder R^{H53}) zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Substitutionen an dieser Position führt. Demzufolge führen die Reste H^{H31} in der CDR-H1 und R^{H53} in der CDR-H2 zu einer stärkeren Diskriminierung von G und den apolaren Resten I, L und M an der Peptidposition 417 bei der Bindung des 9E10-Antikörpers an das Peptid. In der Gesamtheit haben die somatischen Mutationen von $S^{H31}H$ und $G^{H53}R$ zu einer erhöhten Selektivität des 9E10-Antikörpers zu dem Rest E^{P417} im myc-tag-Peptid geführt. Somit könnte man in einer auf 9E10 basierenden Bibliothek über Randomisierung der Positionen 31 und 53 im 9E10 höher affine Binder zu der verkürzten 8-mer Peptidvariante (KLISEF⁴¹⁷EL) selektieren.

Die zunehmende Affinität während der Reifung von Antikörpern kann durch eine zunehmende Assoziationsgeschwindigkeit und/oder abnehmende Dissoziationsgeschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe zustande kommen. In der Literatur wird ein erhöhter kon während der Affinitätsreifung von Antikörpern mit der kinetischen Selektion der Antigenbindungstasche für eine schnelle Antigenassoziation erklärt (Manivel et al., 2000). Die Abnahme des k_{off} wird mit der Stabilisierung einer günstigen Bindungskonformation erklärt, durch versteifende Mutationen, von denen das Antigen langsamer dissoziiert als von einer stärker flexiblen Bindungstasche (Sagawa et al., 2003).

Die Reste H^{H31} und R^{H53} könnten dadurch, dass sie eine teils positiv geladene Oberfläche auf dem Antikörper schaffen, die Kinetik der Assoziation des Peptid-Antikörper-Komplexes durch Anziehung der negativ geladenen Seitenkettenreste E^{P416} , E^{P417} und D^{P418} im Peptid beschleunigen. Allerdings sollte der zu erwartende Effekt auf die Kinetik der Komplexbildung gering ausfallen, da die an der Antikörperoberfläche gelegenen Reste H^{H31} und R^{H53} im Peptid-Antikörper-Komplex von Wassermolekülen umgeben sind und jene zu einer Abschwächung von elektrostatischen Wechselwirkungen führen. In der Tat sind die Änderungen im kon auch gering und konnten am Beispiel der 9E10-Rückmutante $R^{H53}G$ nur bei der Bindung an das schwächer affine myc-tag-Peptid detektiert werden. So kommt es bei der Rückmutation $R^{H53}G$ im 9E10 während der Komplexbildung mit dem myc-tag-Peptid zu einer Abnahme der Assoziationsgeschwindigkeit um das 20-fache. Die Rückmutation $H^{H31}S$ im 9E10 hat dagegen keinen Effekt auf den k_{on} , jedoch einen auf den k_{off} . Mit dieser Einzelmückenmutation zerfallen die Komplexe mit einer 2-fach schnelleren Geschwindigkeit. Fersht diskutiert in einer Zusammenfassung in Structure and Mechanism in Protein Science

am Beispiel von α -Helices (1999), dass Lösungsmittel-exponierte Salzbrücken durchaus einen Beitrag, wenn auch einen geringen, zur thermodynamischen Stabilität von Helices liefern. Danach resultiert der geringe Beitrag aus der Solvatisierung durch das Wasser und aus dem Verlust der Entropie bei der Immobilisierung zweier geladener Seitenreste. Jedoch kann der Entropieverlust durch externe hydrophobe oder van-der-Waals-Wechselwirkungen eines Seitenrestes mit dem Protein kompensiert werden. Histidin 31 könnte analog hierzu einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung der Salzbrücke zwischen E^{P417} in dem Peptid und R^{H53} im 9E10-Fab durch Fixierung der Seitenkette des E^{P417} über van-der-Waals-Wechselwirkungen leisten. Demzufolge könnte die Rückmutation $R^{H53}G$ die Assoziation zwischen dem Antikörper und dem Peptid durch den Wegfall einer elektrostatischen Anziehung verlangsamt haben, während die Rückmutation $H^{H31}S$ zu einem schnelleren Zerfall der Komplexe aufgrund einer fehlenden Stabilisierung der Salzbrücke zwischen E^{P417} und R^{H53} geführt haben könnte. Hierzu könnte man auch den Kooperationseffekt zwischen den Resten H^{H31} und R^{H53} bei der Bindung an das Peptid durch Herstellung einer 9E10-Doppelrückmutante untersuchen. Ein oft zitiertes Beispiel für eine zunehmende Assoziationskinetik als ein Resultat zusätzlicher elektrostatischer Wechselwirkungen wird von Fersht (1999) für den Barstar-Barnase-Komplex gegeben. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass mit dem Austausch von R^{H53} zu G im 9E10 die Änderungen im k_{on} auf Konformationsänderungen in der CDR-H2 zurückzuführen ist.

Der Seitenrest der Schlüsselposition E^{P416} im Peptid wird vom 9E10 in einer vorgeformten Bindungstasche fixiert (Abb. 7.5.A.). Die Bindung des folgenden Seitenkettenrestes E^{P417} im Peptid an den 9E10 ermöglicht eine Drehung des Peptidrückgrates. Zwischen dem $O\gamma$ -Atom des Peptidseitenkettenrestes S^{P415} ist eine Wasserstoffbrücke zum N-Atom der Peptidbindung der Aminosäure D^{P418} oder zum O-Atom der Carboxylgruppe des selben Restes möglich, der wiederum über ein Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke zum N-Atom der Peptidbindung der Aminosäure S^{P415} bilden kann (Abb. 7.5.B.). Die Konformation der Seitenkette von S^{P415} wird dagegen durch Wechselwirkungen mit dem 9E10-Rest Y^{H32} fixiert. Diese Vielzahl der möglichen Wasserstoffbrücken führt zur Stabilisierung der α -helikalen C-terminalen Konformation des Peptides. Interessanterweise kommt es bei einer Überlagerung der $C\alpha$ -Atome der α -Helix aus dem c-Myc-Protein mit denen des myc-tag-Peptides in der Kristallstruktur mit dem 9E10 fast zu einer Überdeckung des $O\gamma$ -Atom des S^{P415} im myc-tag-Peptid mit dem O-Atom der Peptidbindung der Aminosäure I^{I14} im c-Myc-Protein (0,46 Å Abstand) (Abb. 7.5.B.).

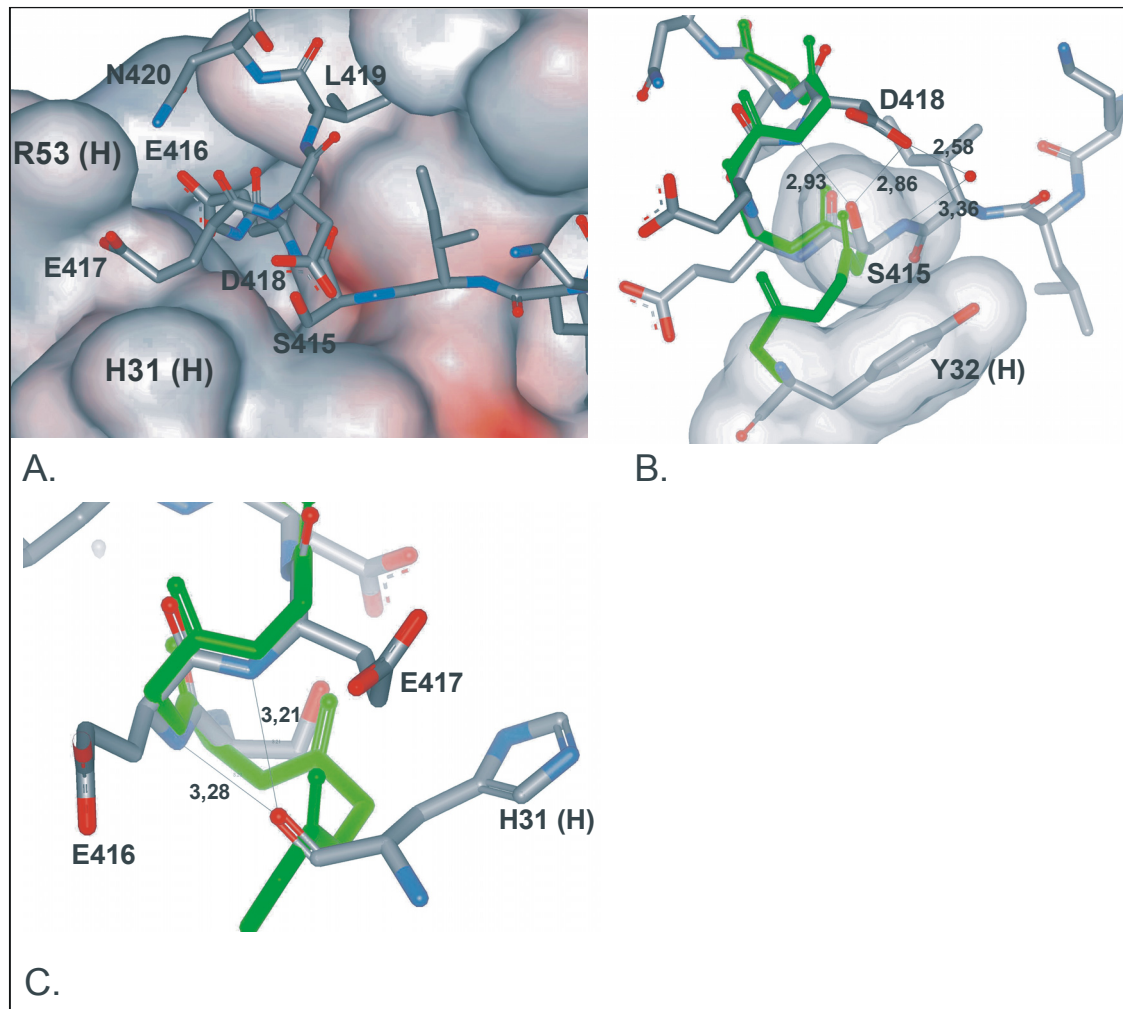


Abb. 7.5.: **Interaktionen des C-Terminus (415-420) des Peptides mit dem 9E10.** (A.) Darstellung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche des 9E10. Der C-Terminus des Peptides wird in einer α -helikalen Konformation erkannt, die unter anderem durch die vom 9E10 vorgeformten Bindungstaschen für die Seitenreste E^{P416} und E^{P417} ermöglicht wird. (B.) Darstellung möglicher intramolekularer Wasserstoffbrücken am N-Terminus der α -Helix. Eine mögliche Wasserstoffbrücke des O γ -Atoms des S^{P415} zum N-Atom der Peptidbindung an der Position i+4 kann die Fortsetzung der α -Helix am N-Terminus mimen (Rückgrat der α -Helix im c-Myc-Protein, grün). (C.) Darstellung der möglichen Wasserstoffbrücken des O-Atoms der Peptidbindung der Aminosäure H^{H31}, wobei wieder die Fortsetzung der α -Helix durch eine Wasserstoffbrücke zur Position i+4 gemimt werden kann (Rückgrat der α -Helix im c-Myc-Protein, grün). Die Abstände zwischen den Atomen sind in Å angegeben.

Auch für das O-Atom der Peptidbindung von H^{H31} in der V_H-Domäne des 9E10 ist eine annähernde Überlagerung mit dem O-Atom der Peptidbindung von L⁴¹³ im c-Myc-Protein (1,18 Å Abstand) möglich (Abb. 7.5.C.). Der Sauerstoff der Peptidbindung von H^{H31} in der

V_H-Domäne des Antikörpers wäre in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zum N-Atom der Peptidbindung der Aminosäuren 416 oder 417 im myc-tag-Peptid auszubilden. Der Serinrest 415 im myc-tag-Peptid und das O-Atom der Peptidbindung des H^{H31} im Antikörper könnten also Wasserstoffbrückenpartner zu den N-Atomen der Peptidbindungen an den Positionen 418 und 416 bzw. 417 im myc-tag-Peptid, wie sie in der α -Helix des c-Myc-Proteins zu diesen Atomen zustande kommen, mimen. All diese Interaktionen fördern die Ausbildung einer α -Helix am C-Terminus des Peptides bei der Bindung an den 9E10. Hier liegt die Vermutung nahe, dass der Antikörper die Bildung einer α -Helix im Peptid bei der Bindung induzieren kann, wie es für die Bindung des H6-Antikörper an sein Peptidantigen berichtet wurde (Zahnd et al., 2004), oder diese, was wahrscheinlicher ist, stabilisieren kann.

In den ELISA-Experimenten zur Bestimmung des K_D der 9E10-Rückmutante G^{H52}S bei der Bindung an das 20-mer c-myc(408-427)-Peptid werden im Vergleich zum 9E10-Fab keine Abweichungen in den Konstanten gemessen. Ein K_D der Bindung der Rückmutante an das 11-mer myc-tag-Peptid konnte aufgrund der kaum nachweisbaren Bindungssignale weder mit der ELISA- noch mit der SPR-Methode bestimmt werden. Zum 20-mer c-myc(408-427)-Peptid gelang es nur mit der SPR-Methode Bindungsunterschiede zwischen dem 9E10 und der 9E10 G^{H52}S-Rückmutante zu detektieren. Auch in den Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid wird der Affinitätsverlust der 9E10-Rückmutante G^{H52}S zum Peptid erkennbar. Die Unterschiede in den ermittelten K_D-Werten aus der ELISA- und SPR-Messung sind auf Methodenunterschiede und auf die unterschiedliche Präsentation der myc-Peptide in beiden Methoden zurückzuführen.

Der K_D erhöht sich um das 40-fache bei der Bindung dieser 9E10-Rückmutante an das immobilisierte 20-mer myc(408-427)-Peptid, dabei war es die 40-fache Abnahme im k_{on}, die zur Abnahme der Affinität geführt hatte. Hier kann man vermuten, dass die Rückmutation G^{H52}S im 9E10 einen Einfluss auf die Konformation der CDR-H2 und/oder der benachbarten CDR-H1 haben könnte und dadurch zu einer Abnahme in der Assoziationsgeschwindigkeit des Komplexes geführt hat. Die Aminosäure G^{H52} ist Bestandteil einer β -Schleife in der CDR-H2 (Abb. 7.6.). Die Konformation kurzer Loops ist abhängig von der Position bestimmter Reste im Loop, z. B. von der Aminosäure G, die es der Kette erlauben könnte, eine ungewöhnliche Konformation anzunehmen (Creighton, 1993). Es ist durchaus möglich, dass der Austausch gegen S zu Änderungen der Konformation in der CDR-H2 geführt haben könnte. Die Abbildung 7.6. zeigt das C α -Atom des G in 3,58 Å-Entfernung zu einem O-Atom der Carboxylgruppe des Restes E^{P417}. Die Aminosäure G^{H52} ist Bestandteil einer

Seitenrestbindungstasche von 9E10, die Wechselwirkungen mit dem Schlüsselrest E^{P416} im Peptid eingeht (siehe auch Abb. 7.12.). In den Substitutionsanalysen am 8-mer Peptid wird die zunehmende Toleranz zu F an der Position 416 beobachtet, die mit der Rückmutation G^{H52}S zustande kommt. Dies könnte ein Hinweis auf Änderungen in der Bindungstasche sein, die durch Konformationsänderungen in der CDR-H2 verursacht werden.

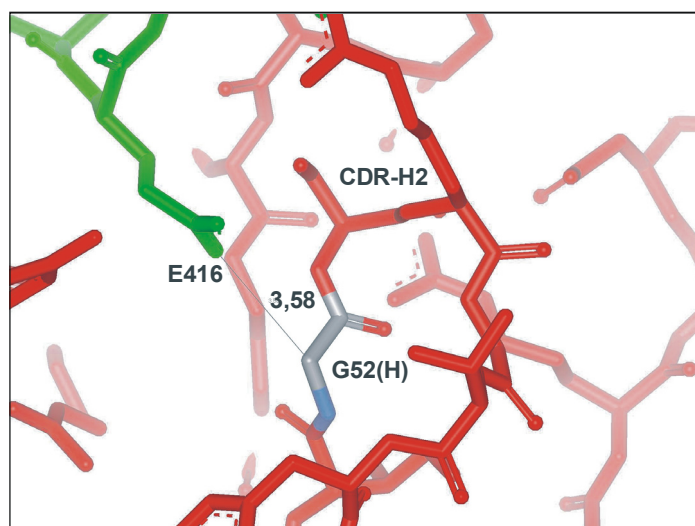


Abb. 7.6.: Lage der Aminosäure G^{H52} in der CDR-H2 der 9E10-V_H-Domäne (rot). Der Abstand zum myc-Peptidrest E^{P416} (grün) beträgt 3,58 Å.

7.4.1.2 Die neutrale Einzelmückmutation H^{H58}Y

Von den in dieser Arbeit charakterisierten Positionen befindet sich die Aminosäure H^{H58} in der CDR-H2 in größter Entfernung zum Peptid (10,58 Å Abstand). Histidin58 hat somit keinen direkten Kontakt zum Peptid. Die Abbildung 7.7. zeigt die Aminosäure H^{H58} in der Kristallstruktur des 9E10-Peptid-Komplexes an der Grenzfläche zur benachbarten V_L-Domäne mit einem Abstand von 4,88 Å zum Rest V^{L94} in der CDR-1. Die Rückmutation H^{H58}Y wird als neutral charakterisiert, da keine messbaren signifikanten Unterschiede in der Gleichgewichtskonstante K_D mit der ELISA- und der SPR-Methode ermittelt wurden. Auch in den Substitutionsanalysen am 11-mer myc-tag- und am 8-mer c-myc(412-419)-Peptid konnten keine wesentlichen Änderungen in der Affinität und Spezifität zum Peptid beobachtet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die somatische Mutation Y^{H58}H einen Einfluss auf die Affinitätsreifung hat, z. B. durch Beeinflussung der Konformation der CDR-H2, der

Domänenorientierung oder des Domänenabstands zwischen V_H und V_L , die zu einer Optimierung der Bindungsgeometrie führen könnten. Diese Mutation ist möglicherweise als Rückmutation neutral. Es ist auch nicht bekannt, welchen Effekt diese Rückmutation in Kombination mit anderen Rückmutationen (z. B. in der CDR-H2) haben könnte. Genauso wenig sind die Reihenfolge der somatischen Mutationen während der Affinitätsreifung und ein möglicher Einfluss der somatischen Mutation $Y^{H58}H$ in einem anderen Kontext bekannt. Allerdings treten im Zuge der Affinitätsreifung auch neutrale Mutationen auf, wie z. B. Yang und Schultz (1999) am Beispiel des 48G7-Antikörpers zeigen konnten.

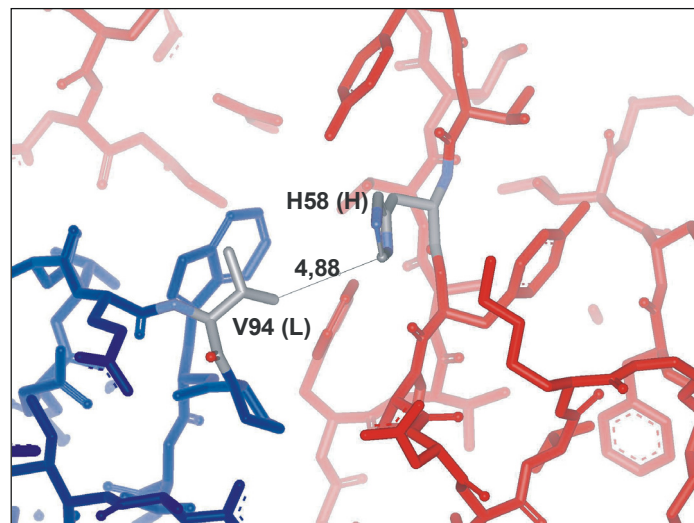


Abb. 7.7.: Lage der Aminosäure H^{H58} in der 9E10- V_H -Domäne (rot). Der Abstand zur V_L -Domäne (blau) beträgt 4,88 Å (V^{L94}).

7.4.1.3 Die Einzelrückmutationen $S^{H100h}Y$ sowie $F^{L30}I$ und $T^{L91}S$

Der 9E10 bindet das myc-tag-Peptid nicht im zentralen Teil der Antigenbindungstasche zwischen den beiden variablen Domänen, wie bei vielen Antikörpern üblich, sondern außerhalb. Das Zentrum der Antigenbindungsstelle wird von der langen CDR-H3 okkupiert, die jetzt gegenüber der CDR-L1, CDR-L2 und CDR-L3 liegt. Die Verschiebung der Antigenbindungsstelle im 9E10 ermöglicht einen Kontakt der langen CDR-H3 mit der CDR-L1 in der Schleifen-Region und der CDR-L3 an der Basis-Region.

Die Aminosäuren S^{H100h} , F^{L30} und T^{L91} befinden sich in der Kristallstruktur des Peptid-9E10-Komplexes in einem Abstand von jeweils 6,54 Å, 5,83 Å und 8,65 Å zum myc-tag-Peptid und haben somit keinen direkten Kontakt zum Peptid. Dennoch ist insbesondere der Einfluss der Reste S^{H100h} und F^{L30} I auf die Affinität des Antikörpers zum Peptid hoch. Die Aminosäuren S^{H100h} , F^{L30} und T^{L91} haben eine Gemeinsamkeit: Sie sind entweder Bestandteil der CDR-H3 (S^{H100h}) oder stehen im direkten Kontakt (F^{L30} I und T^{L91} S) zu dieser. Die Einzelrückmutationen dieser Reste im 9E10 unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf die Kinetiken der Bindung an die myc-Peptide. Während die Fabs mit den V_L -Einzelrückmutationen F^{L30} I und T^{L91} S stärker den k_{off} bei der Bindung an das Peptid beeinflussen, hat die Einzelrückmutation S^{H100h} Y einen größeren Einfluss auf den k_{on} . Die Schlussfolgerung könnte sein: während S^{H100h} eine günstige Bindungskonformation der CDR-H3 mit beeinflusst, die V_L -Reste F^{L30} und T^{L91} diese günstige Bindungskonformation der CDR-H3 stabilisieren.

Nach Furukawa et al. (2001) ermöglicht die Flexibilität in der CDR-H3-Struktur eine effiziente Antikörperreifung dadurch, dass sie eine Vielzahl von Antigenbindungsmodi einnehmen kann. Die Affinität der Einzelrückmutante 9E10 S^{H100h} Y zum löslichen c-myc(408-427)-Peptid nimmt um das 9-fache (ELISA) und zum immobilisierten Peptid um das 70-fache (SPR) ab. Der Rest S^{H100h} liegt nach der Definition von Morea et al. (1998), wonach am C-Terminus die letzten sechs Reste der Region 92-104 (Nummerierung nach Kabat) zu der Basis gezählt werden, nahe der Basis der CDR-H3. Die Kristallstrukturen des im Komplex befindlichen und des freien 9E10-Fab zeigen eine Verschiebung des $C\alpha$ -Atoms des Restes S^{H100h} um 4.1 Å während der Bindung an das Peptid (siehe auch Abb. 3.8. zur Konformationsänderung der CDR-H3). Diese Verschiebung ermöglicht eine Interaktion mit dem in der Basis-Region lokalisierten Rest R^{H95} (Abb. 7.8.). Bei der Bindung an das Peptid bildet das $C\gamma$ -Atom des Restes T^{L91} einen van-der-Waals-Kontakt zum $C\beta$ -Atom des Restes S^{H100h} . Eine Wasserstoffbrücke des $O\gamma$ -Atoms von T^{L91} zum O-Atom der Peptidbindung des Restes Y^{H100g} fixiert unter anderem den neu entstandenen Knick in der CDR-H3. Damit könnten die Reste T^{L91} und S^{H100h} mit an der Ausbildung einer günstigen Bindungskonformation der CDR-H3 beteiligt sein. Die Häufung von somatischen Mutationen (R^{H95} H, S^{H100h} Y und T^{L91} S) in dieser Region und die Konformationsänderungen der CDR-H3-Schleife bei der Bindung an das Peptid unterstreichen die Bedeutung dieses Bereiches für die Bindung.

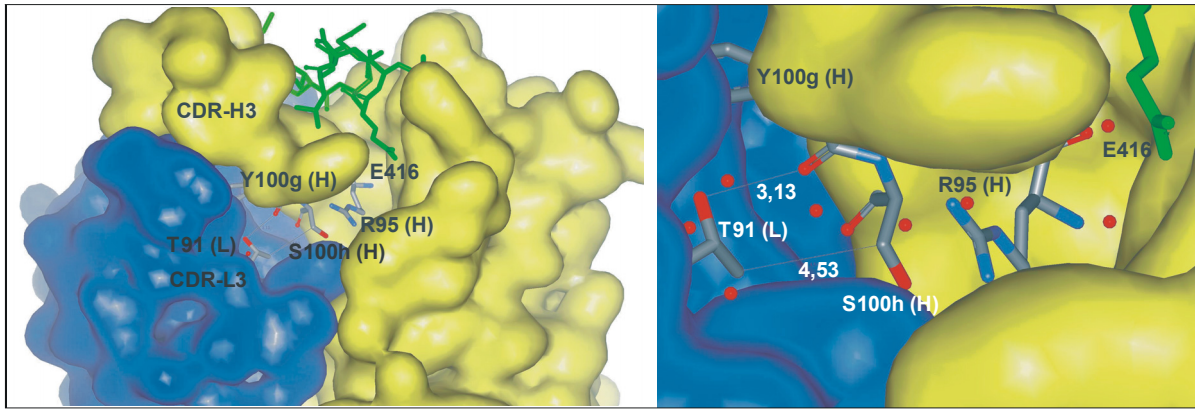


Abb. 7.8.: Dargestellt sind die Aminosäuren S^{H100h} in der V_H -Domäne (gelb) und T^{L91} in der V_L -Domäne (blau) in der Nähe der Basis der CDR-H3. Die Aminosäure T^{L91} steht im direkten Kontakt zu den Aminosäuren S^{H100h} und Y^{H100g} , während S^{H100h} auch einen Kontakt zu R^{H95} bildet. Von den V-Domänen ist die Lösungsmittel zugängliche Oberfläche dargestellt. Das myc-tag-Peptid ist grün dargestellt.

Eine Stabilisierung der Bindungskonformation der CDR-H3 könnte durch eine dichtere Packung des unteren Bereiches der CDR-H3 mit der V_L -Domäne bewirkt werden. Die geringe Auswirkung der Rückmutation $T^{L91}S$ auf die Affinität ist an der Bindung zum myc-tag-Peptid messbar. Der Affinitätseinfluss der Rückmutation $T^{L91}S$ ist mit einer 3- (ELISA) bzw. 8-fachen (SPR) Affinitätsabnahme zum schwächer affinen myc-tag-Peptid geringer als der Einfluss der Rückmutante $F^{L30}I$ in der CDR-L1 mit einer 6- (ELISA) bzw. 10-fachen (SPR) Affinitätsabnahme zum höher affinen c-myc(408-427)-Peptid. Die herabsetzende Wirkung der Rückmutation $F^{L30}I$ auf die Affinität könnte auf einen ungünstigen Entropieeffekt für die freie Standardenergie der Bindung zurückgeführt werden. Der Rest 30 ist von aromatischen Resten der CDR-H3 and CDR-L1 umgeben (Abb. 7.9.). Der große hydrophobe Rest des Phenylalanins kann im Vergleich zum Keimbahngen-kodierten Isoleuzin durch geringere Entropieverluste immobilisiert werden. Dies könnte die Interaktion der CDR-L1 mit der CDR-H3 durch eine stärkere Immobilisierung der CDR-H3-Schleife begünstigen. Dem großen Entropieverlust, der durch die Immobilisierung einer flexiblen CDR-H3 entsteht, wirkt ein Entropiegewinn des Wassers, verursacht durch die Abschirmung der hydrophoben aromatischen Reste bei einer Wechselwirkung der CDR-H3 mit der CDR-L1, entgegen.

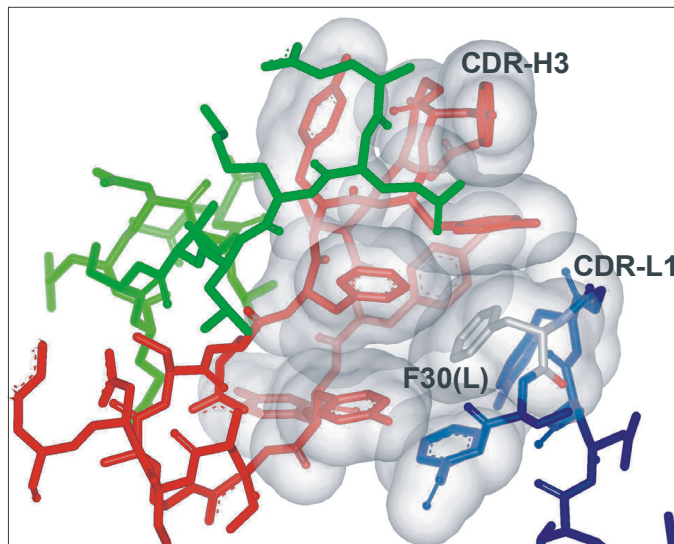


Abb. 7.9.: Die Aminosäure F^{L30} in der V_L -Domäne ist Bestandteil eines Clusters gebildet von aromatischen Resten der CDR-H3 (rot) und CDR-L1 (blau). Das Peptid (grün) bindet außerhalb der konventionellen Bindungstasche.

Die treibende Kraft zur Immobilisierung der CDR-H3 könnte neben der Antigenbindung die Clusterbildung der aromatischen Reste in dieser Region sein, und sie wird wahrscheinlich durch die somatische Mutation $I^{L30}F$ begünstigt. Die Selektion einer längeren CDR-L1 und die somatische Mutation F^{L30} in dieser CDR könnten eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung der sehr langen und flexiblen 9E10-CDR-H3 gespielt haben. Berichte von Ofek and Cardoso zeigen, dass aromatenreiche CDR-H3 der Antikörper 2F5 und 4E10 besser mit Membran-gebundenen viralen Epitopen interagieren können, indem sie zusätzlich mit den Membranlipiden interagieren (Ofek et al., 2004, Cardoso et al., 2005). Beim 9E10 begünstigen die zahlreichen Aromaten in der CDR-H3 die Wechselwirkungen mit der Stabilität gebenden CDR-L1. Diese Beobachtungen unterstreichen eine mehrfunktionale Rolle einer langen und hydrophoben CDR-H3. Der positive Einfluss der leichten Kette auf die Affinitätsreifung liegt unter anderem in der Bereitstellung einer unterstützenden Bindungsplattform für eine günstige Bindungskonformation der CDR-H3 durch die CDR-L1 und CDR-L3, wie mit den Einzelmückenmutationen in der CDR-L1 ($F^{L30}I$) und CDR-L3 ($T^{L91}S$) gezeigt werden konnte.

Die Bedeutung der leichten Domäne für die Bindung wird zudem durch die Experimente von Schiweck et al. belegt, wonach die V_H -Domäne ohne die V_L -Domäne keine nachweisbare Bindung an das myc-Peptid aufweist (Schiweck et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit

dargestellten Ergebnisse belegen die Rolle der 9E10-V_L-Domäne als Bindungsplattform für die lange CDR-H3, die von Ramsland et al. (2001) für Antikörper mit langen CDR-H3, wie z. B. bei den humanen Pot-, Mez- und dem murinen NC10.14-Antikörpern vermutet wurde. Bei diesen Antikörpern kommen die Interaktionen mit der V_L-Domäne vorrangig über die CDR-L3 zustande. Die CDR-H3 des 9E10-Antikörpers bildet auch Kontakte mit der um vier Aminosäuren längeren CDR-L1 aus. Mit der 9E10-Einzelrückmutante F^{L30}I konnte außerdem belegt werden, dass der Beitrag der CDR-L1 für die Affinität des Antikörpers während des Reifungsprozesses sogar größer ist als der der CDR-L3 (T^{L91}S). Analog hierzu nutzen, wie in der Einleitung beschrieben, lange CDR-H3 in V_{HH}-Domänen, wie z. B. der Lysozym-bindende cAb-Lys3-Antikörper, β -Stränge, die normalerweise an die V_L-Domäne binden, als Bindungsplattform (Ramsland et al., 2001). Die Struktur der CDR-H3 solcher Antikörper ist auch weniger variabel (De Genst et al., 2005), was wiederum zeigt, dass die V_L-Domäne einen großen Einfluss auf die Struktur einer langen CDR-H3 nehmen kann und auf diese Weise mit zur hohen strukturellen Variabilität von konventionellen Antikörpern beiträgt.

7.4.2 Einfluss der rückmutierten V-Domänen auf die Bindungseigenschaft

Eine komplettrückmutierte V_H-Domäne im 9E10-Fab führt zu einem Anstieg im K_D um das 400-fache auf 480 ± 20 nM (SPR) bei der Bindung an das immobilisierte c-myc(408-427)-Peptid, welches vor allem auf die 60-fache Abnahme im k_{on} zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu ist der gestiegene K_D (432 ± 2 nM) bei der Bindung an das selbe immobilisierte Peptid mit der Komplettrückmutation der V_L-Domäne weniger durch die Änderungen im k_{on} (10-fache Abnahme) bestimmt. Bei dem in der Literatur beschriebenen anti-Hapten-Antikörper 28B4 ist es ebenfalls die V_H-Domäne, die durch ihre Rückmutation den k_{on} am stärksten (540-fach, k_{on} = $650 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) herabsenkt. Während der gereifte 28B4 mit einem k_{on} von $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ das Hapten 3 nach einem Schloss-Schlüssel-Mechanismus bindet, werden bei der Bindung des Keimbahngen-kodierten 28B4-Antikörpers (k_{on} = $430 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) signifikante Konformationsänderungen in der CDR-H3 und CDR-L1 beobachtet. Hierzu wurden die Kristallstrukturen des gereiften bzw. Keimbahngen-kodierten Antikörpers mit und ohne Hapten betrachtet (Yin et al., 2001). Analog hierzu könnte man ebenfalls auf stärkere Konformationsänderungen in der rückmutierten V_H-Domäne des 9E10-Antikörpers während der Bindung an das Peptid schließen.

Die Rückmutationen in der V_L-Domäne dominieren in ihrem Einfluss auf den k_{off}-Wert. Während die rückmutierte leichte Kette im 9E10 bei der Bindung an das 20-mer Peptid den k_{off} um das 30-fache beschleunigt, beschleunigt die rückmutierte schwere Kette im 9E10 diesen nur um das 7-fache. In der Arbeit von Jimenez et al. (2003) werden ebenfalls Einbußen im k_{off} (7-fach) mit Rückmutationen in der V_L-Domäne des Antikörpers 4-4-20 bei der Bindung an Fluorescein beschrieben. Mit Messungen der Proteindynamik des 4-4-20 wurde gezeigt, dass die somatischen Mutation in der V_L-Domäne die Affinität durch Versteifung des Antikörper-Fluorescein-Komplexes beeinflussen, indem sie das Antigen stärker im Protein verankern und den Komplex dichter packen. Keines der somatisch mutierten Reste in der 9E10-V_L-Domäne befindet sich im direkten Kontakt mit dem Peptid und lediglich zwei nicht mutierte Reste (Y^{L49} und N^{L53}) bilden direkte Kontakte zum Peptid aus, womit der bis zu 360-fache (K_D = 432 ± 2 nM, SPR) bzw. 100-fache (K_D = 760 ± 240 nM, ELISA) Affinitätsverlust mit der Rückmutation dieser Domäne bei der geringen Anzahl der direkten Kontakte zum Peptid erstaunlich ist. Von den insgesamt 696 Å² Interaktionsfläche des 9E10 mit dem Peptid trägt die V_L-Domäne nur 91 Å² (13 %) bei (N. Krauß) und liefert dennoch einen sehr hohen Beitrag zur Affinität. Die V_L-Domäne bildet jedoch direkte Kontakte, insbesondere zu der CDR-H3, die 59 % der Interaktionsfläche mit dem Peptid stellt, mit ihrer CDR-1 und -3, die jeweils an keiner direkten Interaktion mit dem Peptid beteiligt sind, aus. Hier kann der Einfluss in der Stabilisierung einer günstigen Bindungskonformation der Antigenbindungstasche liegen, von der das Peptid langsamer dissoziiert als von einer flexibleren Bindungstasche, wie es im Kapitel 7.4.1.3 für den Einfluss der Positionen F^{L30} und T^{L91} diskutiert wurde.

Die mit der ELISA- und SPR-Methode bestimmten K_D-Werte der Bindung des 9E10-Fab mit der rückmutierten V_L-Domäne L_{Keimbahn}/H_{9E10} an das 20-mer Peptid weisen keine signifikanten Unterschiede (Faktor 1,8) auf. Für das 9E10-Fab mit der rückmutierten V_H-Domäne werden dagegen große Unterschiede zwischen den gemessenen K_D-Werten aus den SPR- (480 ± 20 nM) und ELISA-Messungen (5,3 ± 3,3 µM) beobachtet. Die 11-fache Abweichung der Werte ist nicht so stark wie bei der im Kapitel 7.4.3. diskutierten kompletten 9E10-Rückmutante (500-fach), sie könnte aber auf ähnliche Ursachen zurückgeführt werden und wird später in diesem Kapitel erörtert. Die aus den ELISA-Experimenten stammenden K_D-Werte der Bindung von H_{9E10}/L_{Keimbahn} (760 nM) bzw. H_{Keimbahn}/L_{9E10} (5,3 µM) an das 20-mer Peptid repräsentieren stärker die Beiträge der einzelnen Domänen zur Affinitätsreifung, wie sie für Rückmutanten von anti-Hapten-Antikörpern in der Literatur publizierten werden. So haben die Rückmutanten des anti-Hapten-Antikörpers 28B4 L_{Keimbahn}/H_{28B4} und

L_{28B4}/H_{Keimbahn} einen K_D von 82 nM bzw. 23 μ M bei der Bindung an das Hapten (Yin et al., 2001). Der gereifte 28B4-Antikörper bindet dagegen mit einem K_D von 37 nM sein Antigen. Die gemischten Mutanten L_{Keimbahn}/H_{7G12} und L_{7G12}/H_{Keimbahn} des Ferrochelatase-Antikörpers 7G12 binden mit einem K_D von 203 nM bzw. 1,02 μ M an N-Methylmesoporphyrin (Yin et al., 2003). Auch hier bindet der gereifte Antikörper 7G12 im nM-Bereich das Antigen ($K_D = 20,7$ nM). Die größeren Affinitätseinbußen entstehen hier durch Rückmutationen in den V_H-Domänen. Auch die Reifung der V_L-Domänen spielt eine wesentliche Rolle in der Affinitätsreifung der Antikörper, auch wenn sie nicht den größten Teil zur Affinitätsreifung beiträgt. Ebenso hat es sich beim 9E10-Fab gezeigt, dass die V_H-Domäne während des Reifungsprozesses die Affinität stärker beeinflusst, was allerdings deutlicher aus den ELISA-, und nicht den SPR-Messungen hervorgeht. Die ermittelten K_D -Werte mit der SPR-Methode weisen kaum Affinitätsunterschiede (Faktor 1,1) zwischen der rückmutierten V_H- bzw. V_L-Domäne im 9E10 bei der Bindung des Fabs an das 20-mer Peptid auf. Mögliche Ursachen hierfür werden im Kapitel 7.4.3. am Beispiel der 9E10-Rückmutante diskutiert.

Die gereifte 9E10-V_H-Domäne zeichnet sich dadurch aus, dass von den 14 somatischen Mutationen nur 3 Aminosäurereste im direkten Kontakt zum myc-tag-Peptid stehen. Von den einzeln untersuchten rückmutierten Positionen, die das myc-tag-Peptid direkt kontaktieren (H^{H31} und R^{H53}), ist im Falle der Rückmutation R^{H53}G keine signifikante Änderung in der freien Bindungsenergie bei der Bindung des Antikörpers an das 20-mer Peptid gemessen wurden. Für die 9E10-Rückmutante H^{H31}S wurden keine Bindungsexperimente mit dem 20-mer Peptid durchgeführt, da hier aufgrund von bereits geringen Energieverlusten bei der Bindung an das myc-tag-Peptid auch keine messbaren Änderungen zu erwarten waren. Der Energieverlust der rückmutierten V_H-Domäne im 9E10 bei der Bindung an das lösliche Peptid im ELISA beträgt dagegen 16,5 kJ/mol. Der Gewinn für die freie Standardenergie der Bindung während der Reifung der V_H-Domäne kann nicht allein auf zusätzliche direkte Kontakte des H^{H31} und R^{H53} zum Peptid zurückgeführt werden. Wie bereits erwähnt, bildet auch die somatisch mutierte Aminosäure T^{H100d} einen direkten Kontakt zum Peptid. Ebenso könnte die somatisch mutierte Aminosäure N^{H100c} nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell einen Kontakt zum 20-mer-Peptid bilden. Um dies zu belegen fehlen allerdings experimentelle Daten. Da hier keine Effekte der einzelrückmutierten Reste T^{H100d} und N^{H100c} auf die Bindung zum Peptid untersucht wurden, kann auch keine klare Aussage über einen Beitrag zur freien Standardenergie der Bindung gemacht werden, der allein durch zusätzliche Kontakte des Antikörpers zum Peptid zustande kommt. Die Einzelrückmutationen S^{H100h}Y im 9E10-Fab hat einen starken Einfluss auf die Affinität. Wird im 9E10 der Rest S^{H100h} nach Y

rückmutiert, kommt es zum größten Verlust für die freie Standardenergie (5,3 kJ/mol) bei der Bindung an das lösliche 20-mer Peptid. Demzufolge könnte die fehlende Differenz von ca. 11 kJ/mol auf den Einfluss weiterer somatisch mutierter Reste auf die Bindungsstärke des Antikörpers vor allem aber auch auf kooperative Effekte zwischen den somatisch mutierten Aminosäuren während der Affinitätsreifung des 9E10-Antikörpers, wie ebenfalls für den 48G7-Antikörper beschrieben wurde (Yang et al., 1999), hindeuten. Zahnd et al. (2004) berichten über ein anti-Peptid-scFv, das durch die Ribosomen-Display-Technologie generiert wurde und mit einem K_D von 5 pM an sein Antigen bindet. Die 500-fache Affinitätszunahme während der Reifung des H6-scFv basiert auf wenigen Mutationen, die keinen direkten Kontakt zum Peptid ausbilden. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Affinitätsreifung des hochaffinen H6 durch Modulierung bereits existierender Interaktionen über Änderungen in den FR-Regionen und nicht durch zusätzliche neue Kontakte erreicht wird. Für die Charakterisierung der 9E10-Rückmutanten konnte, wenn auch nur ein geringer, Beitrag für die im direkten Kontakt zum Peptid stehenden Aminosäuren H^{H31} und R^{H53} auf die Affinität durch Bindungsexperimente mit dem schwächer affinen myc-tag-Peptid nachgewiesen werden.

Infolge der Rückmutation der leichten Kette im 9E10 kommt es im ΔG° zu einem Verlust von 11,6 kJ/mol (ELISA) bei der Bindung an das lösliche 20-mer Peptid, wovon der Verlust von 4,2 kJ/mol durch die Einzelmückmutation F^{L30}I verursacht wird. Änderungen in der freien Bindungsenergie für die Bindung des Fab 9E10 T^{L91}S an das 20-mer Peptid wurden nicht bestimmt, da hier aufgrund des geringen Einflusses dieser Rückmutante auf die Affinität auch keine Änderungen zum 20-mer Peptid zu erwarten wären. Es bleibt also eine Differenz von ca. 7 kJ/mol übrig. Da auch in der V_L-Domäne nicht alle somatisch mutierten Aminosäuren einzeln als Rückmutanten charakterisiert wurden, bleibt auch hier die Frage nach dem Beitrag dieser Rückmutationen zur freien Standardenergie der Bindung und nach kooperativen Effekten zwischen den mutierten Resten offen. Speziell die zwei somatisch mutierten Positionen ohne direkten Kontakt zum Peptid I^{L51} und R^{L54} in der CDR-L2 könnten als Rückmutationen einen Einfluss auf die Bindungsenergie nehmen.

Addiert man die relativ zum 9E10 gemessenen Änderungen im ΔG° aus den ELISA-Experimenten der rückmutierten V-Domänen im 9E10 während der Bindung an das lösliche 20-mer Peptid von 11,7 und 16,5 kJ/mol (ELISA), kommt man auf insgesamt 28,2 kJ/mol. Dieser Wert entspricht nicht genau den 31 kJ/mol an gemessener verllorener Bindungsenergie, die mit der kompletten 9E10-Rückmutation erreicht wird. Der Unterschied könnte mit der

Fehlerbreite der K_D -Bestimmung bei der Bindung der 9E10-Rückmutante an das 20-mer Peptid im ELISA begründet werden. Andererseits könnte diese Differenz auch auf einen kooperativen Effekt zwischen den beiden Domänen während der Reifung hindeuten.

Bei der Bindung der 9E10-Rückmutanten an das myc-Peptid finden nur sehr geringfügige Selektivitätsänderungen zu den Schlüsselpositionen LISEX_{XXL} im Peptid statt. Eine hiervon ist die Toleranz gegenüber dem Austausch von I^{P414} gegen Q im 20-mer Peptid, die mit der kompletten Rückmutation der V_H-Domäne im 9E10 hervorgerufen wird. Der Rest I^{P414} im Wildtyppeptid zeigt in eine hydrophobe Tasche des Antikörpers (Abb. 7.10.). Die Methylgruppe des Restes T^{H100d} in der V_H-Domäne ist Teil dieser Tasche. Eine Rückmutation von T^{H100d} auf das im Keimbahnen-kodierte S könnte die Toleranz des polaren Q durch die nun fehlende Methylgruppe erklären. Die Methylgruppe des Antikörperrestes T^{H100d} befindet sich in direkter räumlicher Nachbarschaft zum Rest I^{P414} im Peptid (Abb. 7.10.). Diese Selektivitätsänderung könnte direkt auf die Rückmutation T^{H100d}S zurückgehen.

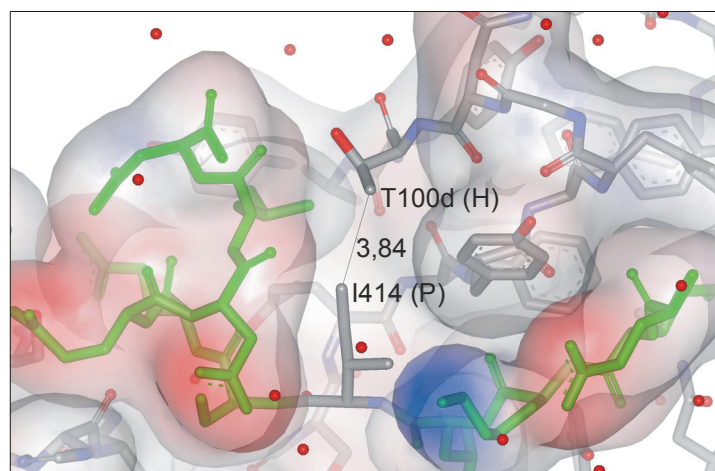


Abb. 7.10. : **Bindungstasche des Peptidschlüsselrestes I^{P414}, die unter anderem vom 9E10-Rest T^{H100d} in der CDR-H3 und vom Peptid (grün) ausgekleidet wird. Beide Reste sind 3,84 Å voneinander entfernt.**

Die Kreuzreaktivität von L_{Keimbahn}/H_{9E10}-Fab mit dem an der Schlüsselposition L^{P419} zu S substituierten 20-mer-Peptid wäre möglicherweise ein Hinweis auf eine zunehmende Flexibilität der Seitenrestbindungstasche (Abb. 7.5.) für den Rest L^{P419}. Die Aminosäure L^{P419} befindet sich, nach den kristallographischen Daten, in keinem direkten Kontakt mit der V_L-Domäne. Dennoch kann die Selektivitätsänderung zu dieser Schlüsselposition bei der

Bindung an das Peptid auf einen indirekten Einfluss der V_L -Domäne zurückgeführt werden. Ähnliches wird auch bei der Bindung des Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ an das myc-tag-Peptid beobachtet. Auch hier ändert sich die Selektivität zum Rest L^{P419} im myc-tag-Peptid. Auch die Substitution des Restes L^{P419} gegen H bewirkt eine schwache Bindung des Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ an das substituierte myc-tag-Peptid, die nur bei diesem Fab-Konstrukt beobachtet wurde. Ein Grund hierfür könnte wiederum die zunehmende Flexibilität in der Bindungstasche des 9E10 sein. Die Bindung des Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ an das gegen H^{P419} substituierte 20-mer-Peptid konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Mit der rückmutierten V_H -Domäne im Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ werden im Vergleich zu der rückmutierten V_L -Domäne im Fab $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ deutlich stärkere Unterschiede in der Bindungsspezifität des Antikörpers zum myc-Peptid beobachtet. Dies betrifft insbesondere die Erkennung des Restes E^{P417} im Peptid. Die Substitutionsanalysen am myc-tag-Peptid zeigen die Selektivitätsänderung des Antikörpers, die mit der Rückmutation der jeweiligen V -Domäne korrelieren. Ein Peptid mit den Substituenten D, G, L, M, S, T oder V an der Position 417 wird im Gegensatz zum Fab der V_L -Rückmutante von der V_H -Rückmutante gebunden. Die Toleranz gegenüber den Resten G, L, M, S, T und V sowie die Diskriminierung von Y an Position 417 im Peptid ist auf die bereits diskutierten 9E10-Einzelmückmutationen $H^{H31}S$ und $R^{H53}G$ zurückzuführen. Die Toleranz des Antikörpers $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ gegenüber dem Rest D bei der Bindung an das Peptid könnte durch einen kombinatorischen Effekt der multiplen Rückmutationen in der 9E10- V_H -Domäne verursacht worden sein. Bei der Bindung an das höher affine 20-mer Peptid sind nur noch Selektivitätsunterschiede zwischen den einzelrückmutierten Domänen für die Reste I, K, L und W an Position 417 zu erkennen. Damit war es anhand der unterschiedlichen Affinitäten zu den Peptiden gelungen die feinen Unterschiede in der Selektivität besser zu definieren.

Weitere weniger ausgeprägte Unterschiede in der Bindungsspezifität zwischen den Fabs $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ und $L_{Keimbahn}/H_{9E10}$ äußern sich bei der Bindung an das 11-mer myc-tag-Peptid in der Erkennung der Position D^{P418} . Ein einfachsubstituiertes myc-tag-Peptid mit den Austausch H, K, L oder N an der Position 418 wird von 9E10 mit der rückmutierten V_H -Domäne besser gebunden als von 9E10 mit der rückmutierten V_L -Domäne. Aufgrund der polyspezifischen Reaktion des anti-Maus-Nachweisantikörpers mit den durch F, I, L, T, V oder Y substituierten Peptide an der Position 418 kann die Erkennung des Restes D^{P418} im 20-mer Peptid nicht weiter diskutiert werden. Signifikante Unterschiede in der Erkennung des Restes D^{P418} im höher affinen 20-mer Peptid sind nicht mehr zu erkennen.

Die Rückmutationen in der V_H-Domäne hat demnach die Bindungsspezifität des Antikörpers durch eine Feinmodulation der Erkennung einzelner Peptidreste durch direkt im Kontakt zum Peptid stehenden Antikörperreste, wie H^{H31}, R^{H53}, T^{H100c} herabgesetzt.

7.4.3 Bindungseigenschaft der 9E10-Keimbahnrückmutante

Die Bindungsexperimente mit dem Keimbahn-kodierten 9E10 an das c-myc(408-427)-Peptid im kompetitiven ELISA und in der SPR an der Biacore lieferten reproduzierbare Ergebnisse. In den kompetitiven ELISA-Experimenten ist eine vollständige Konkurrenz der Bindung mit freiem Peptid nicht möglich. Der abgeschätzte K_D von ca. 2 mM ist sehr hoch, aber für biochemische Vorgänge liegt er noch im relevanten Bereich. In den Kontrollmessungen mit dem randomisierten 20-mer c-myc-Peptid setzt die Konkurrenz erst bei 8 mM Peptid ein. Bei diesen hohen Peptidkonzentrationen ist die Konkurrenz auf unspezifische Bindungen und Auswascheffekte zurückzuführen. Beim nativen c-myc-Peptid setzt sie bereits bei 0,3 mM ein. Es dürfte sich somit um eine reale, wenn auch sehr schwache Bindung der 9E10-Rückmutante an das c-myc(408-427)-Peptid handeln. Der mit der SPR-Methode ermittelte, deutlich abweichende K_D ($3,93 \pm 0,04 \mu\text{M}$) ergab sich aus dem Verhältnis $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Dabei wurde der Berechnung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} wieder das einfache Modell einer Ein-Schritt-Bindung zugrunde gelegt. Die K_D -Werte, die mit beiden Meßmethoden ermittelt wurden, weichen um einen Faktor von ca. 500 voneinander ab. Auch die errechneten Differenzen im ΔG° relativ zum 9E10 für die beiden einzeln rückmutierten V-Domänen von 14,6 kJ/mol für L_{Keimbahn} und 14,8 kJ/mol für H_{Keimbahn} sind in der Summe höher als der $\Delta\Delta G^\circ$ von 20 kJ/mol für die 9E10-Rückmutante. Die sehr große Abweichung im K_D -Wert aus den ELISA- und SPR-Messungen könnte den folgenden Rückschluss zulassen: Das in der SPR-Messung über den N-Terminus immobilisierte 20-mer myc-Peptid wird von der 9E10-Rückmutante besser gebunden als das lösliche Peptid. Veränderungen am N-Terminus des 20-mer Peptides, verursacht z. B. durch den Austausch E^{P409}F im c-myc(408(E⁴⁰⁹F)427)-Peptid, durch eine N-terminale Markierung mit dem Fluorophor Abz (Schiweck et al., 1997) oder durch eine Kürzung des N-Terminus um die Aminosäuren A^{P408} und E^{P409} haben immer zu einem Affinitätsanstieg geführt. Das Fab L_{9E10}/H_{Keimbahn} zeigt gleichfalls eine erhöhte Affinität zum immobilisierten 20-mer Peptid in den SPR-Analysen. Unterschiede in der Präsentation des Peptides zwischen der immobilisierten Form auf der festen Phase und der löslichen Form sowie ein Einfluss des für die Thiolkopplung verwendeten N-terminalen Cysteins auf die

Affinität können ebenfalls die beobachteten Abweichungen erklären. Bei den im ELISA mit einer höheren Affinität bindenden Fabs $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ und 9E10 konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zu den K_D -Werten aus den SPR-Messungen festgestellt werden. Nicht auszuschließen wäre auch die folgende Ursache: Der beschriebene K_D der Bindung der 9E10-Rückmutante an das 20-mer myc-Peptid mit der SPR-Methode ergab sich aus dem Verhältnis $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ und wurde nicht aus Gleichgewichtstitrationen ermittelt. Zur Berechnung des K_D wurde das Modell des Ein-Schritt-Bindungsmechanismus zugrunde gelegt. Mit dem Modell könnte jedoch die Bindung des 20-mer Peptides an die 9E10-Keimbahnrückmutante nicht ausreichend beschreiben worden sein. Demgegenüber steht jedoch die gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem Ein-Schritt-Bindungsmodell. Ein komplexerer Mechanismus, als angenommen, könnte das Bindungsverhalten der 9E10-Rückmutante deutlicher widerspiegeln und auf größere Konformationsänderungen in der Bindungstasche der Keimbahnrückmutante hindeuten. Solche mehrstufigen Bindungsmechanismen wurden z. B. von Gakamsky et al. (2004) für einen MHC-Peptid-Komplex-bindenden T-Zellrezeptor (sT1), der auch eine langsame Assoziationsgeschwindigkeit im Bereich von $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und in kristallographischen Studien merkliche Konformationsänderungen bei der Bindung aufweist, vorgeschlagen.

Rückmutationen auf die Keimbahngensequenz im 9E10 bewirken einen ca. 3300-fach zunehmenden K_D zum immobilisierten c-myc(408-427)-Peptid, verbunden mit einer um den Faktor 90 langsamer werdenden Assoziationsgeschwindigkeit und einer 40-fach schnelleren Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe. In der Literatur beschriebene Keimbahngenkodierte Antikörper haben ähnliche K_D -Werte wie der Keimbahngenkodierte 9E10. Der ungereifte anti-Hapten-Antikörper N1G9 hat einen $K_D = 5 \text{ }\mu\text{M}$ (SPR) und erreicht mit der Affinitätsreifung einen K_D von 200 nM zum immobilisierten NP2-HEL (Sagawa et al., 2003). In der Literatur findet man auch Bindungskonstanten (SPR) für den 28B4, einem katalytisch aktiven anti-Hapten-Antikörper, mit $K_D = 37 \text{ nM}$. Für das dazugehörige Keimbahngenkodierte Fab liegt der K_D bei 25 μM (Yin et al., 2001). Das in der selben Arbeitsgruppe beschriebene 7G17-Fab bindet mit einem K_D von 20,7 nM N-Methylmesoporphyrin, das Keimbahn-kodiertes Fab bindet dagegen mit einem K_D von 1,96 μM an das Antigen (Yin et al., 2003). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Reaktion zwischen dem Fab des anti-JWJ1(Hapten)-Antikörper 48G7 und dem Hapten beträgt $16 \pm 2 \text{ nM}$ (SPR). Wird der Antikörper auf seine Keimbahngensequenz rückmutiert, steigt der K_D auf $46 \pm 11 \text{ }\mu\text{M}$ (Yang and Schultz 1999). Bei anti-Peptid-Antikörpern gegen das 38-mer Peptid PS1CT3 wurden K_D -Werte (SPR) von 0,4 bis 30,3 μM für Antikörper aus der primären Immunantwort und

Werte von 100 bis 700 nM für Antikörper aus der sekundären Immunantwort mit dem immobilisierten Peptid gemessen (Manivel et al., 2000). Die mit der SPR-Methode gemessenen Unterschiede zwischen dem 9E10-Fab und seiner kompletten Rückmutante sind vergleichbar mit den Daten für die Reifung anderer Antikörper aus der Literatur.

Rückmutationen im 9E10 führen zu einer Spezifitätsänderung des Antikörpers. Mit der vollständigen Rückmutation des 9E10 verringert sich die selektive Erkennung des Restes E^{P416} im humanen 18-mer c-myc-Peptid durch den Antikörper. Neben dem E werden nun auch die Reste F, I und L an der Position 416 im 18-mer-Peptid toleriert. Auch eine sehr schwache Bindung an das 18-mer mit den Aromaten W und Y an dieser Position kann nachgewiesen werden. Die Erkennung von Q an der Position 416 im 18-mer ist dagegen nicht mehr nachweisbar. Bemerkenswerterweise ist diese veränderte Selektivität der 9E10-Rückmutante bei der Bindung an das substituierte c-myc(408(E⁴⁰⁹F)-427)-Peptid nicht zu erkennen. In der Kristallstruktur des 9E10 im Komplex mit dem Peptid befindet sich der Peptidrest E^{P416} in einer engen Bindungstasche, die von der CDR-H2 und -H3 ausgebildet wird (Abb. 7.12.).

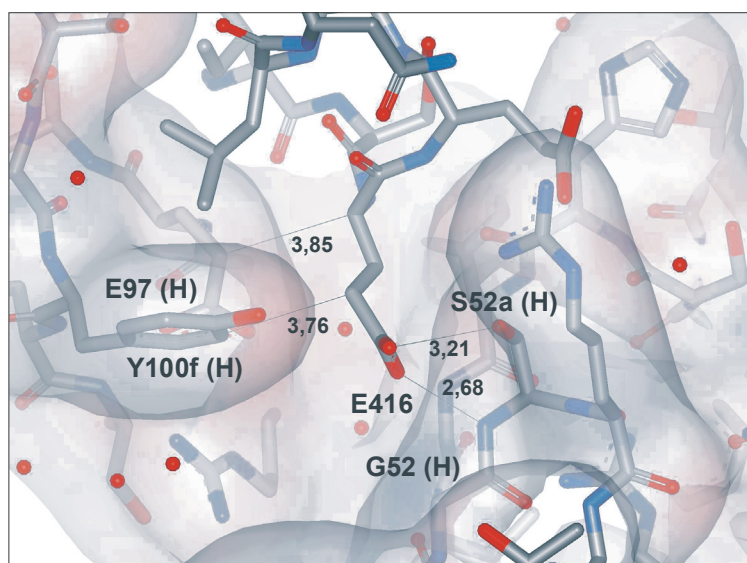


Abb. 7.12. : **Bindungstasche des Peptidschlüsselrestes E^{P416}, die unter anderem von den CDR-H3-Resten E^{H97} und Y^{H100f} sowie von den CDR-H2-Resten G^{H52} und S^{H52a} ausgekleidet wird. Die Abstände zwischen den Atomen sind in Å dargestellt. Vom 9E10 ist die Oberfläche zusätzlich gezeigt.**

Die zunehmende Kreuzreaktivität der 9E10-Rückmutante mit den an der Position 416 substituierten 18-mer-Peptiden könnte auf eine zunehmende Flexibilität oder auf Konformationsänderungen in dieser schmalen Seitenrestbindungstasche hindeuten, da nun

Peptide mit großen Aminosäuren (F, W und Y) und verzweigten Aminosäuren (I und L) stärker gebunden werden können. Da diese Beobachtung nur bei der kompletten Rückmutante des 9E10 und nicht bei den Einzelmückmutanten gemacht werden konnte, könnte sie ein Hinweis auf Kooperationseffekte zwischen den somatisch mutierten Resten sein.

Keine Änderungen konnten hingegen in der Erkennung des Schlüsselrestes L^{P413}, das mit einer sehr hohen Selektivität erkannt wird, festgestellt werden. Die Seitenrestbindungstasche des L^{P413} wird von der V_H- und V_L-Domäne gebildet. Dies könnte darauf hindeuten, dass es während der Reifung zu keinen Änderungen des Winkels zwischen den beiden V-Domänen kommt, die zu einer Änderung der Seitenrestbindungstasche des L^{P413} führen würden.

Eine große Anzahl substituierter 20-mer myc-Peptide, die in den Substitutionsanalysen mit einer deutlich höheren Affinität als der Wildtyp gebunden werden, weisen vermehrt R, F, I, L, W und Y als Substituenten auf. Studien von Lo Conte et al. zur Zusammensetzung der Aminosäuren in der Antikörper-Antigen Interaktionsfläche (Lo Conte et al., 1998) zeigen einen signifikant hohen Anteil an aromatischen Resten, wie z. B. Y und W. Geladene Reste wie D, E und K, jedoch nicht R, treten seltener auf (Sundberg und Mariuzza, 2002). Die Bevorzugung solcher Reste ist auf die Fähigkeit dieser Reste, eine Vielzahl günstiger Wechselwirkungen einzugehen, zurückzuführen. So kann zum Beispiel R hydrophobe Kontakte, Wasserstoff- und Salzbrücken ausbilden.

Ein entscheidendes Kriterium für die spezifische Bindung des gereiften 9E10-Fab an das myc-Peptid ist die Anzahl der Schlüsselpositionen im Peptid. Die Schlüsselpositionen LISEX_{XXL} werden vom Keimbahngen-kodierten 9E10 ebenfalls größtenteils sehr selektiv erkannt. Diese Selektivität ist bereits durch die Keimbahngensequenz des 9E10-Antikörpers und durch die Eigenschaft des myc-Peptides, im Komplex eine α -Helix auszubilden, vorgegeben. Mit zunehmender Affinität des 9E10 zum myc-Peptid werden durch die hohe Gesamtaffinität neben den Schlüsselresten auch solche Reste toleriert, die dem Originalrest strukturell oder chemisch ähnlich sind. Die Kreuzreaktivität des 9E10-Fab mit dem murinen c-myc(K⁴¹⁷E)-Peptid ist auf die hohe Gesamtaffinität des 9E10 und die Toleranz der Mutation der Schlüsselposition I^{P414} gegen T zurückzuführen. Threonin wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu I toleriert. Dieser Austausch ist dafür verantwortlich, dass das murine Peptid, wenn auch schwächer, vom 9E10 in den Peptidspot-Analysen gebunden wird. Diese Kreuzreaktivität des 9E10 deckt sich mit der von Siegel et al. (1998) beobachteten Bindung des 9E10 an das murine c-Myc-Protein in Immunoblots und in murinen Zellen. Das 9E10-Fab bindet das aviane c-myc- und das virale v-myc-Peptid nicht. Diese Beobachtung stimmt mit

der Aussage von Evan et al. (1985) überein, wonach das 9E10-IgG keine Bindung an das aviane und virale Myc-Protein aufwies. Die komplette 9E10-Rückmutante bindet hingegen das aviane 20-mer c-myc-Peptid trotz zweier für die Gesamtaffinität der Bindung ungünstigen Austausche in den Schlüsselpositionen. Auch das Fab $L_{9E10}/H_{Keimbahn}$ weist noch eine sehr schwache Kreuzreaktivität mit dem avianen c-myc-Peptid aufweist, was wiederum belegt, dass die V_H -Domäne den größeren Einfluss auf die Spezifität des 9E10 hat. Da die Kreuzreaktivität des 9E10-Fab mit dem avianen c-myc-Peptid trotz der sehr hohen Gesamtaffinität des Fabs nicht nachzuweisen war, liegt die Vermutung nahe, dass es während der Reifung des Antikörpers zu Konformationsänderungen im Paratop gekommen ist.

Substitutionsanalysen am 20-mer Peptid mit dem N-terminalen Austausch $E^{P409}F$ zeigen eine veränderte Bindungsspezifität des ungereiften 9E10-Fab-Fragmentes, was auf eine höhere strukturelle Variabilität des ungereiften Paratops schließt. Der ungereifte 9E10 passt sich an. Auch das aviane 20-mer c-myc-Peptid wird zwar von $L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}$ -Fab jedoch nicht vom 9E10-Fab gebunden. Dennoch wurde keine deutliche Reaktion des $L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}$ -Fab mit dem N-terminal substituierten avianen 20-mer c-myc(408($E^{409}F$)-427)-Peptid gemessen. Das heißt, dass mit der höheren Affinität von $L_{Keimbahn}/H_{Keimbahn}$ -Fab zum substituierten 20-mer c-myc(408($E^{409}F$)-427)-Peptid auch die Kreuzreaktivität mit dem avianen c-myc($E^{409}F$)-Peptid abnimmt. Der zusätzliche Kontakt von F^{P409} am N-Terminus der Peptide erfolgt zu aromatischen Resten in der CDR-H3, die im übrigen Bestandteil eines Aromatenklusters, gebildet von der CDR-H3 und -L1, sind (siehe auch Abb. 7.9.). Damit wären die beobachteten Spezifitätsänderungen auf eine Immobilisierung der flexiblen CDR-H3 zurückzuführen. Es könnten demzufolge mehrere Bindungsmodi im Keimbahn-kodierten 9E10-Antikörper existieren. Diese Erkenntnis stimmt gut mit der weit verbreiteten Annahme überein, dass die Bindungsstellen der Keimbahnantikörper in der Lage sind, viele Konformationen anzunehmen und eine Vielzahl von Epitopen nach einem *induced fit*-Mechanismus zu binden. Unlängst zeigten Sethi et al. (2006) am Keimbahn-kodierten Antikörper 36-65 die Bindung dreier unterschiedlicher Peptide in verschiedenen Bindungsmodi jedoch, innerhalb einer gleichen Paratoptopologie. Der Vergleich von vier Kristallstrukturen des ungebundenen Fab hat dagegen eine Vielzahl von Konformationen der CDRs ergeben.

7.5 Fazit der Affinitätsreifung von 9E10

Durch die Kombination der Daten aus der 9E10-myc-tag-Peptid-Kristallstruktur mit der biochemischen Charakterisierung der Bindungseigenschaft der Keimbahngenrückmutanten des 9E10 zu c-myc-Peptiden unterschiedlicher Länge und somit Affinität gelang es einen Einblick in die Affinitätsreifung des 9E10-Antikörpers zu bekommen.

Mit der Reifung des 9E10-Antikörpers verringert sich der K_D der Bindung an das lösliche 20-mer Peptid (ELISA) um das 30000-fache, während der K_D für die Bindung an das immobilisierte 20-mer-Peptid (SPR) nur um das 3300-fache abnimmt. Dabei sind es sowohl Änderungen in k_{on} als auch in k_{off} , die zu einer Affinitätszunahme des 9E10 zum immobilisierten 20-mer Peptid während der Affinitätsreifung des Antikörpers geführt haben. Die Assoziations-geschwindigkeit stieg um das ca. 90-fache an, während die Dissoziationsgeschwindigkeit um das ca. 40-fache abnahm. Die Affinitätsreifung hat demnach eine schnellere Assoziation des Antikörpers mit dem Peptid und einen langsameren Zerfall des gebildeten Komplexes zufolge. Hierbei sind es vor allem die somatischen Mutationen in der V_H -Domäne, die für die schnellere Kinetik der Assoziation selektiert wurden. Die somatischen Mutationen in der V_L -Domäne beeinflussen hingegen stärker den Dissoziationsprozess des Komplexes. Solche Änderungen in den kinetischen Konstanten könnten auf eine Umorganisation der Bindungstasche während der Reifung hindeuten. Beim vergleichsweise 48G7-Antikörper korrelieren die Konformationsänderungen in der Bindungstasche mit Änderungen in der Dissoziationsrate k_{off} , die primär zum Affinitätsgewinn während der Reifung führte (Wedemayer et al., 1997).

Die Affinitätszunahme des 9E10 zum 20-mer myc-Peptid ist nicht vorrangig durch die Ausbildung zusätzlicher Kontakte zum Peptid charakterisiert. Die zusätzlichen Kontakte zum myc-Peptid, die mit den hier analysierten Resten H^{H31} und R^{H53} (Abb. 7.13.) generiert werden, haben nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtaffinität. Mit diesen Resten als auch mit dem somatisch mutierten Rest T^{H100d} werden jedoch Seitenreste im Paratop eingeführt, die mit der Bindung von Resten in den Nicht-Antigenen interagieren und somit zu einer feinen Modulation der Spezifität des 9E10 führen.

Von den hier analysierten somatischen Mutationen sind die für die Gesamtaffinität des Antikörpers entscheidenden Reste solche, die die Konformation der myc-Peptid bindenden CDRs direkt oder indirekt beeinflussen. Eine der entscheidenden Positionen ist die nahe der

CDR-H3-Basis liegende Aminosäure S^{H100h} , die 6,54 Å vom Peptid entfernt ist. Die Konformation der langen, flexiblen und aromatenreichen CDR-H3 spielt eine bedeutende Rolle im Affinitätsreifungsprozess des 9E10. Hierbei scheinen die CDR-L3 und vor allem die CDR-L1 in der V_L -Domäne die Funktion einer Plattform für eine günstige Bindungskonformation der langen und herausragenden CDR-H3 zu übernehmen (Abb. 7.13.), wobei der CDR-L1 durch ihre verlängerte Struktur und hydrophoben Reste (drei Aromaten) eine neue bedeutende Rolle zugekommen ist.

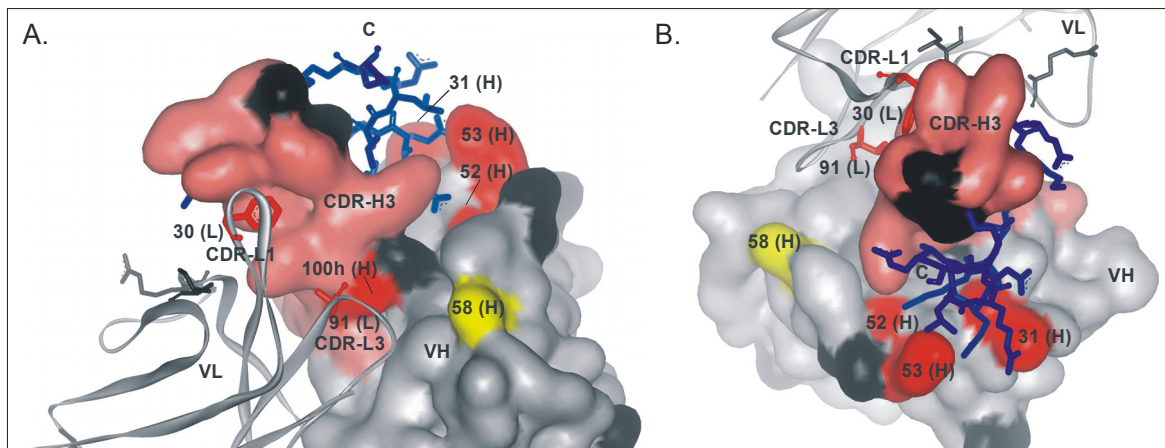


Abb. 7.13. : **Seitenansicht (A.) und Draufsicht (B.) auf die Bindungsregion des 9E10-Antikörpers mit den charakterisierten rückmutierten Resten (rot).** Die rückmutierten Einzelpositionen S^{H100h} , F^{L30} , T^{L91} sowie G^{H52} haben einen Einfluss auf die Affinität, wobei S^{H100h} als Bestandteil der CDR-H3 und F^{L30} in der CDR-L1 den größten Effekt haben. Die rückmutierten Einzelpositionen H^{H31} und R^{H53} verfeinern die selektive Erkennung der Peptidposition E^{P417} . Der neutrale Rest H^{H58} ist in Gelb und die nicht charakterisierten Aminosäuren in Schwarz dargestellt. Von der V_H -Domäne ist die Oberfläche und von der V_L -Domäne das Peptidrückgrat gezeigt. Das Peptid (410-423) ist in Blau dargestellt.

Diese Annahme stützt sich auf den beschriebenen Affinitätsverlust des 9E10 bei der Bindung an die myc-Peptide mit den Rückmutationen der Reste F^{L30} in der CDR-L1 und T^{L91} in der CDR-L3. Die Konformation oder Flexibilität der myc-Peptid kontaktierenden CDR-H2 wird direkt von der in derselben CDR liegenden Aminosäure G^{H52} bestimmt. Die CDR-Konformation beeinflussenden Reste S^{H100h} , F^{L30} (indirekt) und G^{H52} bestimmen die Affinität des Antikörpers, wobei die CDR-H3 und die mit ihr im Kontakt stehende CDR-L1 den größten Einfluss haben. Das könnte ein Hinweis auf konformationelle Änderungen in der

Bindungstasche während des Reifungsprozesses sein, die zu einer für die Bindung günstigen Umorganisation und Stabilisierung des Paratops führen könnten. Die Affinitätsreifung des 9E10 hat gezeigt, dass somatische Mutationen vorrangig eine optimale Bindungskonformation aufbauen und fixieren. Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Affinitätsreifung des Ferrochelatase-Antikörpers 7G12 (Yin et al., 2003) und scheint ein gängiges Prinzip in der Antikörperaffinitätsreifung zu sein.

Wie die Substitutionsanalysen belegen, bindet bereits das ungereifte 9E10-Fab das myc-Peptid in einer ähnlichen Art und Weise wie das gereifte Fab. Mit der Affinitätsreifung des Antikörpers wird dieser Bindungsmodus optimiert (Schloss-Schlüssel-Prinzip). Die Schlüsselpositionen LISEXSL im myc-Peptid werden während des Antikörperreifungsprozesses größtenteils mit einer unveränderten Selektivität vom Antikörper erkannt. Eine feine Optimierung der selektiven Erkennung der Schlüsselpositionen im Peptid durch 9E10 erfolgt vorrangig durch Reste, die nicht direkt an der Erkennung der Schlüsselpositionen im Peptid beteiligt sind. Die für die Bindungsenergie wichtigen Reste, die z. B. die Seitenkettenbindungstaschen für die Schlüsselpositionen im Peptid ausbilden, unterliegen kaum somatischen Mutationen. Eine Ausnahme bildet der Rest S^{H100d} der zu T mutiert wurde. Diese Reste sind für eine Bindung bereits optimiert. Die Seitenkettenbindungstaschen unterliegen im Laufe des 9E10-Reifungsprozesses lediglich einer Feinmodellierung ihrer Bindungsgeometrie. Die Peripherie ist dagegen mehr für stärkere Optimierungen geeignet, da sie toleranter gegenüber Mutationen ist. Die bereits in den Keimbahngenen des 9E10 kodierten Aminosäuren, die die Seitenrestbindungstaschen speziell für die Schlüsselreste L^{P413} und E^{P416} im Peptid ausbilden, könnten ihre Funktion darin haben, das Peptid in eine Bindungskonformation zu zwingen, während durch somatische Mutationen die gebundene Konformation des Peptides stabilisiert wird.

Von den zwanzig somatischen Mutationen wurden sieben *hot spot*-Positionen als einzelne Rückmutationen charakterisiert (Abb. 7.13.). Der Einfluss der weiteren dreizehn Austausche als Einzelmutationen ist im Detail nicht bekannt. In einer einfachen Annahme kann jede somatische Mutation zum Affinitätsgewinn führen. Es können aber auch neutrale Mutationen, wie am Beispiel der 9E10 Rückmutation H^{H58}Y gezeigt werden konnte, auftreten. Das konnte auch am Beispiel des 48G7-Antikörpers gegen das Phosphonathapten JWJ1 gezeigt werden (Yang und Schultz, 1999). Über die Hälfte der insgesamt neun Mutationen, die als Rückmutationen und somatische Mutationen von Yang und Schultz beschrieben wurden, sind neutral. Auch kann der Effekt einer einzelnen Mutation in Kombination mit anderen Mutationen variieren. Am 48G7-Antikörper sind, wie bereits berichtet, energetische

Kooperationen zwischen den Mutationen für die 30000-fache Zunahme der Affinität während der Reifung der Antikörpers verantwortlich (Yang und Schultz, 1999). Kooperationseffekte zwischen den Rückmutationen im 9E10 müssen die geringfügig veränderte Selektivität zum E^{P416}-Rest bewirkt haben.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf Mutationen in den CDRs. In der Literatur sind viele Beispiele für Antikörper mit nanomolaren bis pikomolaren Affinitäten beschrieben, die auch viele Mutationen in den FRs aufweisen. Die FR-Mutationen scheinen auch zur Affinitätsreifung beizutragen und sollten in solchen Affinitätsreifungsstudien nicht außer Acht gelassen werden.

Im ungereiften 9E10 scheinen mehr schwache Bindungsmodi zu existieren, die über Konformationsänderungen oder einer Einschränkung der Flexibilität der Bindungsregion modifiziert werden. Hier unterscheidet sich die Affinitätsreifung des 9E10-Antikörpers nicht wesentlich von der in der Literatur beschriebenen anti-Hapten-Antikörpern wie dem 48G7 (Wedemayer et al., 1997), dem 7G12 (Yin et al., 2003) oder den anti-Peptid-Antikörpern wie dem H6-scFv (Zahnd et al., 2004). Im Gegensatz zu der langen CDR-H3-Region des anti-Protein-Schwereketten-Antikörpers cAb-Lys3 (DeGenst et al., 2004) ist die lange CDR-H3 des 9E10-Antikörpers flexibel und ist wahrscheinlich in der Lage mit der unterstützenden Wirkung der V_L-Domäne eine Vielzahl von Bindungskonformationen einzunehmen. Die Philosophie der Reifung des 9E10-Antikörpers liegt vor allem in der Stabilisierung der Bindungskonformation der für die Affinität und Spezifität wichtigen CDR-H3 durch die V_L-Domäne.

Um die strukturellen Vorgänge während des Reifungsprozesses des 9E10-Antikörpers besser verstehen zu können, wären kristallographische Untersuchungen des 9E10 und der kompletten 9E10-Rückmutante mit und ohne des 18-mer c-myc(410-427)- und des modifizierten 20-mer c-myc(408(E⁴⁰⁹F-427)-Peptides sehr aufschlussreich. Auch kann so die Rolle der Wassermoleküle für die Komplementarität der Bindung untersucht werden. Änderungen in der Flexibilität der CDRs können zusätzlich durch Studien zur Proteindynamik aufgeklärt werden. Um Änderungen in der Bindungsspezifität des Keimbahn-kodierten und des gereiften Antikörpers intensiver zu betrachten, könnten verschiedene Peptide und Antigenklassen in ihrer Bindung getestet werden. So können statistische Peptidbibliotheken erstellt und die Polyspezifität des gereiften und des ungereiften 9E10 im Vergleich untersucht werden. Denkbar wären auch Kristallstrukturanalysen mit selektierten Peptiden aus einer Peptidbibliothek.

7.6 Fehlerbetrachtung der Peptidspot-Analysen

In den Peptidspot-Analysen waren Bindungen des 9E10-Fab und seiner Rückmutanten an die myc-Peptide mit Affinitäten vom unteren nM-Bereich bis in den unteren mM-Bereich (ELISA, SPR) nachweisbar. Kramer et al. (1997) beschreiben ebenfalls einen breiten Nachweisbereich für die Bindung des CB4-1-Antikörpers an sein Epitopeptid (300 nM bis < 1 mM). Die beobachteten affinitätsbedingten scheinbaren Selektivitätsänderungen einiger 9E10-Rückmutanten und des 9E10-Fab zu einigen Peptidpositionen in den Substitutionsanalysen (6.6.2.1.) sollten mit einer weiteren Methode überprüft werden. Hierfür könnte man die Affinitäten der 9E10-Rückmutanten zum Wildtyppeptid und zu einigen ausgewählten substituierten Peptiden bestimmen und mit den Affinitäten des 9E10 zu denselben Peptiden ins Verhältnis setzen.

Die Bindungssignale in der Arbeit von Kramer et al. sind reproduzierbar und haben eine mittlere Standardabweichung von 0,18, die nicht mit der Länge der Peptide (6-13 AS) korreliert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Reproduzierbarkeit der Bindungssignale in den Peptidspotanalysen am Beispiel der Bindung des $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ -Fabs an das myc-tag-Peptid in drei Substitutionsanalysen belegt werden. Die mittlere Standardabweichung lag hier bei 0,15. Das Bindungsmuster von $L_{\text{Keimbahn}}/H_{9E10}$ an das einzelsubstituierte myc-tag-Peptid war bei unterschiedlichen Detektionszeiten und Proteinkonzentrationen der Fabs unverändert. Es traten lediglich Unterschiede in der Bindung an Cystein-substituierte Peptide zwischen dem löslich im Periplasma exprimierten Fab und dem *in vitro* rückgefalteten Protein auf. Die verstärkte Bindung der rückgefalteten Fab-Fraktion an Cystein-substituierte Peptide könnte auf frei vorhandene reduzierte SH-Gruppen in den Proteinen deuten. Kramer et al. untersuchten weiterhin die Reinheit der synthetisierten Peptide mittels RP-HPLC und MS. Dabei stellte sich heraus, dass die Reinheit der Peptide in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz verschieden sein kann. Für ein 11-mer Peptid konnte ein bis zu 70% reines Produkt ermittelt werden. Deletionen in den Peptidsequenzen sind ebenfalls laut Kramer et al. möglich. Jedoch sind selbst bei Ausbeuten von unter 40% an korrekt synthetisiertem Peptid sehr zuverlässige Bindungssignale möglich. Das heißt, dass die Methode sehr sensitiv ist und selbst geringe Mengen an korrekt synthetisierten Peptiden detektiert werden können. Zum Vergleich soll hier erwähnt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten löslichen Peptide (11-mer myc-tag und 20-mer c-myc(408-427)) eine Reinheit von 70-75% aufwiesen (P. Henklein). Die Frage nach korrekt synthetisierten Peptiden stellt

sich insbesondere bei längeren Peptiden (> 10 AS). In der vorliegenden Arbeit werden Peptide mit bis zu zwanzig Aminosäuren Länge direkt auf der Membran synthetisiert. Bei der spezifischen Bindung der kompletten 9E10-Rückmutante an das 20-mer c-myc(E⁴⁰⁹F)-Peptid in den Substitutionsanalysen ist zu erkennen, dass noch ein ausreichend hoher Anteil der Peptide die korrekte Aminosäuresequenz beinhaltet. Peptidspots mit längeren Peptiden könnten für nachfolgende experimentelle Arbeiten über die Synthese von löslichen und gereinigten Peptiden mit anschließender Immobilisierung auf der Membran hergestellt werden. Diese Technik ist jedoch aufwendiger und lässt aus praktischen Gründen nur eine limitierte Anzahl von Peptiden auf einer Membran zu.

Literaturverzeichnis

- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J. and Krönke, M. (1996) The novel human TNF-receptor p55-associated WD-repeat protein FAN mediates neutral Smase activation. *Cell*, 86, 937-947, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Adams, C., Macleod, M.K.L., Milner-White, E.J., Aitken, R., Garside, P. and Stott, D.I. (2003) Complete analysis of the B-cell response to a protein antigen, from in vivo germinal centre formation to 3-D modelling of affinity maturation. *Immunology*, 108, 274-287
- Adler, S., Frank, R., Lanzavecchia, A. and Weiss S. (1994) T-cell epitope analysis with peptides simultaneously synthesized on cellulose membranes: fine mapping of two DQ dependent epitopes. *FEBS Lett*, 352, 167-170, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Afonin, P.V., Fokin, A.V., Tsygannik, I.N., Mikhailova, I.Y., Onoprienko, L.V., Mikhaleva, I.I., Ivanov, V.T., Mareeva, T.Y., Nesmeyanov, V.A., Li, N., Pangborn, W.A., Duax, W.L. and Pletnev, V.Z. (2001). Crystal structure of an anti-inter-leukin-2 monoclonal antibody Fab complexed with an antigenic nonapeptide. *Protein Sci.*, 10, 1514–1521, Zitat aus Cardoso et al., 2005
- Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. and Chothia, C. (1997) Standard conformations for the canonucal structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 273, 927-948, Zitat aus Shirai et al., 1999
- Andersson, K. (2004) Characterization of biomolecular interactions using a multivariate approach. Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, Schweden
- Andrew, S. M. and Titus, J. A. (1997) *Current Protocols in Immunology* (2.7.1-2.7.12)
- Barclay, A.N. et al. (1997) *The leucocyte antigen facts book* (Academic Press, San Diego. CA)
- Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 251, 1211-1217, Zitat aus Siegel et al., 1998

- Boder, E.T., Midelfort, K.S. and Wittrup, K.D. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS*, 97, 10701-10705
- Burton, D. R. (1990) Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biol. Sci.* 15, 64-69
- Cannon, J. P., Haire, R. N. and Litman, G. L. (2002) Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat Immunol*, 3, 1200-1207, Zitat aus Kaufman, 2002
- Cao, J.Y., Liang, M.F., Meng, Q.L., Wang, X.F., Xu, Y.G., Guo, K.G., Zhan, M.Y., Bi, S.L. and Li, D.X. (2004) [Baculovirus expression of two human recombinant neutralizing IgG monoclonal antibodies to hepatitis A virus.] *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 18 (1), 20-23, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Cardoso, R.M.F., Zwick, M.B., Stanfield, R.L., Kunert, R., Binley, J.M., Katinger, H., Burton, D.R. and Wilson, I.A. (2005) Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity*, 22, 163-173
- Creighton, T. E. (1993) *Proteins*. W. H. Freeman and Company, 184-185 und 226
- De Genst, E., Handelberg, F., Van Meirhaeghe, A., Vynck, S., Loris, R., Wyns, L. and Muyldermans S. (2004) Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody. *J Biol Chem*, 279, 53593-53601
- De Genst, E., Silence, K., Ghahroudi, M.A., Decanniere K., Loris, R., Kinne J., Wyns, L. and Muyldermans, R. (2005) Strong in vivo maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires. *J Biol Chem*, 280, 14114-14121
- Decanniere, K., Desmyter, A., Lauwereys, M., Ghahroudi, M. A., Muyldermans, S. and Wyns, L. (1999) A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure*, 7, 361-370, Zitat aus De Genst et al., 2005
- Decanniere, K., Muyldermans, S. and Wyns, L. (2000) Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: More Structures, more Canonical Classes? *J Mol Biol*, 300, 83-91
- Demarest, S.J., Chen, G., Kimmel, B.E., Gustafson, D., Wu, J., Salbato, J., Poland, J., Elia, M., Tan, X., Wong, K., Short, J. and Hansen, G. (2006) Engineering stability into

Escherichia coli secreted Fabs leads to increased functional expression. Protein Eng Des Sel, In Publikation

Demirel, M.C. and Lesk, A.M. (2005) Molecular forces in antibody maturation. PRL, 95, 208106-1-208106-3

Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H.D., Poortmans, F., Hamers., R., Muyldermans, S., Wyns, L. (1996) Crystal structure of a camel single-domain V_H antibody fragment in complex with lysozyme. Nat Struct Biol, 3, 803-811, Zitat aus Ramsland et al., 2001

Dooley, H. and Flajnik, M.F. (2005) Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Eur J Immunol, 35, 936-45

Edmundson, A.B., Ely, K.R., Abola, E.E., Schiffer, M. and Panagiotopoulos, N. (1975) Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. Biochemistry, 14, 3953-3961

Ely, K.R., Herron, J.N., Harker, M. and Edmundson, A.B. (1989) Three-dimensional structure of a light chain dimer crystallized in water; conformational flexibility of a molecule in two crystal forms. J Mol Biol, 210, 601-615, Zitat aus Ramsland et al., 2001

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Molecular and Cellular Biology, Dec., 3610-3616

Fan, Z.C., Shan, L., Guddat, L.W., He, X.M., Gray, W.R., Raison, R.L., Edmundson, A.B. (1992) Three-dimensional structure of an Fv from a human IgM immunoglobulin. J Mol Biol, 228, 188-207, Zitat aus Ramsland et al., 2001

Feldhaus, M.J., Siegel, R.W., Opresko, L.K., Coleman, J.R., Yeung, Y.A., Cochran, J.R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J. et al. (2003) Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* display library. Nat Biotechnol, 21, 163-170, Zitat aus Skerra 2003

Fernandez, L.A. (2004) Procaryotic expression of antibodies and affibodies. Curr Opin Biotech, 15, 364-373, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005

Fernandez, L.A., Sola, I., Enjuanes, L. and de Lorenzo, V. (2000) Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatans of *Escherichia coli* cultures by use of

- the hemolysin system. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5024-5029, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Fersht, A. (1999) *Structure and mechanism in protein science*. By W.H. Freeman and Company
- Foote, J, Eisen H.N. (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *PNAS*, 92, 1254-1256
- Frank, R. (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48, 9217-9232
- Frank, R. and Overwin, H. (1996) Spot synthesis: Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Meth Mol Biol*, 66, 149-169, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Frank, R., Güler, S., Krause, S. and Lindemaier, W. (1991) Facile and rapid “spot synthesis” of large numbers of peptides on membrane sheets. In *Peptides 1990* (E. Girald and D. Andreu, eds). ESCOM, Leiden p. 151, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanjance, L and Goldberg, M.E. (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Meth*, 77, 305-319
- Fuchs, P., Breitling, F., Little, M. and Dübel, S. (1997) Primary structure and functional scFv antibody expression of an antibody against the human protooncogen c-myc. *Hybridoma* vol. 16, no. 3, 227-233
- Furukawa, K., Shirai, H., Azuma, T. and Nakamura, H. (2001) A Role of the third complementarity-determining region in the maturation of an antibody. *J Biol Chem*, vol. 276, no. 29, 27622-27628
- Gakamsky, D., Leuscher, F.I. and Pecht, I. (2004) T cell receptor-ligand interactions: A conformational preequilibrium or an induced fit. *PNAS*, 101, 9063-9066
- Griebel, U. (2005) Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Fab-Fragmente des anti-c-myc Antikörpers 9E10. Diplomarbeit an der Universität Potsdam, Deutschland
- Groves, M.A. and Osbourn (2005) Applications of ribosome display to antibody drug discovery. *Expert Opin Biol Ther*, 5, 125-135, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005

- Grunberg, J., Knogler, K., Waibel, R. and Novak-Hover, I. (2003) High-yield production of recombinant antibody fragments in HEK-293 cells using sodium butyrate. *Biotechniques*, *34*, 968-972, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Guddat, L.W., Shan, L., Broomell, C., Ramsland, P.A., Fan, Z., Anchin, J.M., Linthicum, D.S. and Edmundson, A.B. (2000) The three-dimensional structure of a complex of a murine Fab (NC10.14) with a potent sweetener (NC174): An illustration of structural diversity in antigen recognition by immunoglobulins. *J Mol Biol*, *302*, 853-872, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Gunsteren van, W.F. et al. (1996) Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag ETHZ (www.Ethz.ch/gromos), Zitat aus dem Swisspdbviewer
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, *363*, 446-448, Zitat aus Nguyen et al., 2002
- Hanes, J., Jermutus, L. and Pluckthun, A. (2000) Selecting and evolving functional proteins in vitro by ribosome display. *Adv Protein Chem*, *328*, 404-430, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Harpaz, Y. and Chothia, C. (1994) Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set is close to that containing variable domains. *J Mol Biol*, *238*, 528-539
- Harris, L. I., Skaletsky, E. and McPherson, A. (1998) Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*, *275*, 861-872
- Harvey, B.R., Georgiou, G., Hayhurst, A., Jeong, K.J., Iverson, B.L. and Rogers, G.K. (2004) Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries. *PNAS*, *101*, 9193-9198, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, *342*, 76-78, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M. and Höhne, W. (2001) Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized

- using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Engineering*, vol. 14, no. 10, 803-806
- Hoffmüller, U., Russwurm, M., Kleinjung, F., Ashurst, J., Volkmer-Engert, R., Oschkinat, H., Koesling, D. and Schneider-Mergener, J. (1999) Interaction of a PDZ domain with a synthetic library of all human protein C-termini. *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.* In press, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Holmgren, A. and Bränden, C.I. (1989) Crystal structure of chaperone PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature*, 342, 248-251, Zitat aus Kaufman, 2002
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. and Winter, G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4133-4137
- Jiang, X., Ookubo, Y., Fuji, Y., Nakano, H. and Yamane, T. (2002) Expression of a Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an *Escherichia coli* in vitro coupled transcription/translation system. *FEBS Lett*, 514, 290-294, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Jimenez, R., Salazar, G., Yin, J., Joo, T. and Romesberg, F. E. (2004) Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *PNAS*, 101, 3803-3808
- Johnson, G., Wu, T.T. (1998) Preferred CDR3H lengths for antibodies with defined specificities. *Int Immunol*, 10, 1801-1805, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. und Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst*, A47, 110-119
- Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I. et al. (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*, 11, 620-627
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest (U.S. Dept. Of Health and Human Services, Natl. Inst. Health, Bethesda).
- Kaufman, J. (2002) The origins of the adaptive immune system: whatever next? *Nature Immunology*, 3, 1124-1125

- Knittler, M.R. and Haas, I.G. (1992) Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.*, *11*, 1573-1581, Zitat aus Nuttall et al., 2002
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*, 495-497
- Kramer, A. and Schneider-Mergener, J. (1998) Synthesis and application of peptide libraries bound to continuous cellulose membranes. *Meth Mol Biol*, *87*, 25-39
- Kramer, A., Keitel, T., Winkler, K., Stöcklein, W., Höhne, W. and Schneider-Mergener, J. (1997) Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*, *91*, 799-809
- Kramer, A., Reinicke, U., Dong, L., Hoffmann, B., Hoffmüller, U., Winkler, D., Volkmer-Engert and Schneider-Mergener, J. (1999) Spot synthesis: observations and optimizations. *J Peptide Res*, *54*, 319-327
- Kramer, A., Schuster, A., Reineke, U., Malin, R., Volkmer-Engert, R., Landgraf, C. and Schneider-Mergener, J. (1994) Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tool for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *METHODS (Comp Meth Enzymol)*, *6*, 388-395, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Krauß, N., Wessner, H., Welfle, K., Welfle, H., Scholz, Ch., Seifert, M., Zubow, K., Aÿ, J., Hahn, M., Scheerer, P., Skerra, A. and Höhne, W. (2007) The structure of the 9E10 Fab fragment/c-myc epitope peptide complex reveals a novel binding mode driven by the heavy chain hypervariable loops and involving Fab dimerization. In Vorbereitung.
- Laffly, E. and Sodoyer, R. (2005) Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after... *Human Antibodies*, *14*, 33-55
- Langdon, S. D., Inaioki, M., Kelsoe, G., Tedder, T. F. (2000) Germline sequences of VH7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution. *Immunogenetics*, *51*, 241-245
- LaVallie, E.R. and McCoy, J.M. (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, *16*, 501-506, Zitat aus Schiweck et al., 1997
- Lavigne, P., Crump, M. P., Gagne, S. M., Hodges, R. S., Kay, C. M., Sykes, B. D. (1998) Insights into the mechanism of heterodimerization from the 1H-NMR solution

- structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper. *J Mol Biol*, 281, 165-181, (PDB: 1A93)
- Lefranc, M.P. and Lefranc, G. (2004) Immunglobulin lambda (IgL) genes of human and mouse., *Molecular biology of B cells*. (Honjo, T., Alt, F.W. and Neuberger, M.S. eds) Academic press, Elsevier science, 37-59, Zitat aus IMGT-Datenbank
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (2001) Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* *gor* mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Exp Purif*, 23, 338-347, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Li, Y., Li, H., Yang, F., Smith-Gill, S. J. and Mariuzza, R. A. (2003) X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen. *Nat Struct Biol*, 10, 482-488
- Litman, G.W., Anderson, M.K. and Rast, J. P. (1999) Evolution of antigen binding receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 109-147
- Lo Conte L., Chothia C. and Janin J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*, 285, 2177-98, Zitat aus De Genst et al., 2004)
- Mai, S. and Martensson, I.L. (1995) The c-myc protein represses the lambda 5 and TdT initiators. *Nucleic Acids Res*, 23, 1-9, Zitat aus Siegel et al., 1998
- Manivel, V., Sahoo, N. C., Salunke, D. M. and Rao, K. V. S. (2000) Maturation of an antibody response is governed by modulations in flexibility of the antigen-combining site. *Immunity*, 13, 611-620
- Martinez-Jean, C. et al. (2001), *Exp Clin Immunogenet*, 18, 255-279, Zitat aus IMGT-Datenbank
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-554, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Milstein, C. and Neuberger, M.S. (1996) Maturation of the immune response. *Adv Prot Chem*, 49, 451-485
- Morea, V., Tramontano, A., Rustici, M., Chothia, C. and Lesk, A. M. (1998) Conformations of the third hypervariable region in the V_H-domain of immunglobulins. *J Mol Biol*, 275, 269-294

- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*, 520-562
- Müller-Loennies, S., MacKenzie, C. R., Patenaude, S. I., Evans, S. V., Kosma, P., Brade, H., Brade, L. and Narang, S. (2000) Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for clamydial lipopolysaccharide. *Glycobiology*, *10*, 121-130
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kD glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, *46*, 291-300
- Nair, S. K., Burley, S. K. (2003) X-ray structures of Myc-Max and MAD-Max recognizing DNA: molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*, *112*, 193-205, (PDB: 1NKP)
- Nguyen, H. P., Seto, N. O. L., MacKenzie, R., Brade, L., Kosma, P., Brade, H. and Evans, S. V. (2003) Germline antibody recognition of distinct carbohydrate epitopes. *Nat Struct Biol*, *10*, 1019-1025
- Nguyen, V. K., Su, C., Muyldermans, S. and van der Loo, W. (2002) Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*, *54*, 39-47
- Ning, D., Junjian, X., Xunzhang, W., Wenying, C., Qing, Z., Kuanyuan, S., Guirong, R., Xiangrong, R., Qingxin, L. and Zhouyao, Y. (2003) Expression, purification and characterization of humanized anti-HBs Fab fragment. *J Biochem*, *134*, 813-817, Zitatus Laffly and Sodoyer 2005
- Noia, J. D. and Neuberger, M.S. (2002) Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*, *419*, 43-48
- Nuttall, J., Vine, N., Headlington, J.L., Drake, P., Frigerio, L. and Ma, J. K.-C. (2002) ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur. J. Biochem*, *269*, 6042-6051
- Pancer, Z., Amemlya, Ch. T., Ehrhardt, G. R. A., Ceitlin, J., Gartland, G. L. and Cooper M. D. (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, *430*, 174-180
- Paschke, M., Zahn, G., Warsinke, A. und Höhne, W. (2001) New series of vectors for phage display and prokaryotic expression of proteins. *Biotechniques*, *30*, 720-726

- Paulyo, T., Hilinski, G.J., Chiu, P.T. Hansen, D.E., Choi, Y.J., Ratner, D.I., Shah-Mahoney, N., Southern, C.A. and O'Hara, P.B. (2006) Genetic and fluorescence studies of affinity maturation in related antibodies. *Molecular Immunology*, *43*, 812-821
- Pollock, D.P., Kutzko, J.P., Birck-Wilson, E., Williams, J.L., Echelard, Y. and Meade, H.M. (1999) Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods*, *231*, 147-157, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Ramsland, P. A., Kaushik, A., Marchalonis, J. , Edmundson, A. B. (2001) Incorporation of long CDRs into V domains: Implications for the structural evolution of the antibody-combining site. *Exp Clin Immunogenet*, *18*, 176-198
- Ramsland, P.A., Brock, C.R., Moses, J., Robinson, B.G., Edmundson, A.B., Raison, R.I. (1999) Structural aspects of human IgM antibodies expressed in chronic B lymphocytic leukemia. *Immunotechnology*, *4*, 217-229, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Ramsland, P.A., Shan, L., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A., Fan, Z.C., Guddat, L.W., Edmundson, A.B.(2000) An unusual human IgM antibody with a protruding HCDR3 and high avidity for its peptide ligands. *Mol Immunol*, *37*, 295-310, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Rathanaswami, P., Roalstad, S., Roskos, L., Su, Q.J., Lackie, S, Babcook, J. (2005) Demonstration of an in vivo sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *334*, 1004-1013
- Reinecke, U., Sabat, R., Kramer, A., Stigler, R.-D., Seifert, M., Michel, T., Volk, D. and Schneider-Mergener, J. (1995) Mapping of protein-protein contact sites using cellulose-bound peptide scans. *Mol Diversity*, *1*, 141-148, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Reuter, M., Schneider-Mergener, J., Kupper, D, Meidel, A., Mackeldanz, P., Krüger, D. and Schroeder, C. (1999) Regions of endonuclease EcoRII involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. *J Biol Chem*, *274*, 5213-5221, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Riblet; R. Molecular Biology of B cells. Honjo, T., Alt, F.W. and Neuberger, M. eds, Elsevier Academic Press, London (2004), 19-26, Zitat aus IMGT-Datenbank

- Rogozin, I. B. (2001) Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase error spectrum. *Nature Immunology*, 2, 530-536, Zitat aus IMGT-Datenbank
- Rosner, K., Winter, D. B., Tarone, R. E., Lange Skovgaard, G., Bohr, V. A. and Gearhart, P. J. (2001) Third complementarity-determining region of mutated VH immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P, and N components than non mutated genes. *Immunology*, 103, 179-187
- Sagawa, T., Oda, M., Ishimura, M., Furukawa, K. and Azuma, T. (2003) Thermodynamic and kinetic aspects of antibody evolution during the immune response to hapten. *Molecular Immunology*, 39, 801-808
- Saini, S. S., Allore, B., Jacobs, R. M., Kaushik, A. (1999) Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. *Eur J Immunol*, 29, 2420-2426, Zitat aus Saini und Kaushik 2001
- Saini, S. S., Kaushik, A. (2001) Origin of bovine IgM structural variants. *Molecular Immunology*, 38, 389-396
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P.-A. and Stahl, S. (2002) Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol*, 96, 129-154, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R. and Edmundson, A.B. (1973) Structure of a I-type Bence-Jones protein at 3.5 Å resolution. *Biochemistry*, 12, 4620-4631, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Schiweck, W., Buxbaum, B., Schätzlein, Ch., Neiss, H. G., Skerra, A. (1997) Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: the V_H domain has an extended CDR-3H and exhibits unusual solubility. *FEBS Letters*, 414, 33-38
- Schmidt, W.E., Jung, H.D., Palm, W., Hilschmann, N. (1983) Beitrag zur dreidimensionalen Strukturaufklärung der Antikörper: Die Primärstruktur des kristallisierbaren monoklonalen Immunglobulins IgG Kol. I. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, 364, 713-747, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Schneider-Mergener, J., Kramer, A. and Reineke, U. (1996) Peptide libraries bound to continuous cellulose membranes: tools to study molecular recognition. In *Combinatorial Libraries* (Cortese, R. ed.) W. De. Gruyter, Berlin, 53-68, Zitat aus Kramer et al., 1999

- Schultz, J., Hoffmüller, U., Krause, G., Ashurst, J., Macias, M., Schmieder, P., Schneider-Mergener, J. and Aschkinat, H. (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol*, 5, 19-24, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Schultz, P.G. and Lerner, R. A. (2002) Completing the circle. *Nature*, 418, 485
- Sethi, D. K., Agarwal, A., Manivel, V., Rao, K. V. S. and Salunke, D. M. (2006) Differential epitope positioning within the germline antibody paratope enhances promiscuity in the primary immune response. *Immunity*, 24 (4) 429-438
- Shirai, H., Kidera, A., Nakamura, H. (1999) H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Letters*, 455, 188-197
- Siegel, J., Brandner, G. and Hess, R. D. (1998) Cross-reactivity of the monoclonal antibody 9E10 with murine c-MYC. *International Journal of Oncology*, 13, 1259-1262
- Sinha, N. and Smith-Gill, S.J. (2005) Molecular dynamics simulation of a high-affinity antibody-protein complex: the binding site is a mosaic of locally flexible and preorganized rigid regions. *Cell Biochem Biophys*, 43, 253-273
- Skerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single step purification of antibody Fab fragments. *Gene*, 141, 79-84
- Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 683-693
- Sundberg, E.J. and Mariuzza, R.A. (2002) Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv Protein Chem*, 61, 119-160
- Tegge, W., Frank, R., Hofmann, F. and Dostmann, W.R. (1995) Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry*, 34, 10569-10577, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Teichmann, S.A. and Chothia, C.J. (2000) Immunoglobulin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 296, 1367-1383
- Tuckey, C.D. and Norea, C.J. (2002) Selection for mutants improving expression of an anti-MAP kinase monoclonal by filamentous phage display. *J Immunol Methods*, 270, 247-57

- van den Elsen, J.M., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F. J., and Rose, D.R. (1999) Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *PNAS*, *96*, 13679–13684, Zitat aus Cardoso et al., 2005
- Vanhove, M., Usherwood, Y.K. and Hendershot, L.M. (2001) Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP in vivo but require light chains to trigger their release. *Immunity*, *15*, 105-114
- Wedemayer, G.J., Patten, P.A., Wang, L.H., Schultz, P.G. and Stevens, R.C. (1997) Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science*, *276*, 1665-1669
- Winkler, D., Stigler, R.-D., Hoffmann, B., Zahn, G., Höhne, W., Rappsilber, J., Schmieder, P., Oschkinat, H. and Schneider-Mergener, J. (1998) Elucidation of the interaction of an anti TGF α antibody with its peptide epitope using combinatorial cyclic peptide libraries, binding studies, NMR, computer modelling and flexible docking techniques. In *Peptide 1996* (Ramaga, R. and Epton, R. eds.) Mayflower Scientific Ltd, Kingswinford, UK, 913-914, Zitat aus Kramer et al., 1999
- Wright, A. and Morrison, S.L. (1997) Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnology*, *15*, 26-32, Zitat aus Laffly and Sodoyer 2005
- Wu, T. T., Johnson, G., Kabat, E. A. (1993) Length distribution of CDR3H in antibodies. *Proteins*, *16*, 1-7, Zitat aus Ramsland et al., 2001
- Yang, P.L. and Schultz, P.G. (1999) Mutational analysis of the affinity maturation of antibody 48G7. *J Mol Biol*, *294*, 1191-1201
- Yin, J., Beuscher IV, A.E., Andryski, S.E., Stevens, R.C. and Schultz, P.G. (2003) Structural plasticity and the evolution of antibody affinity and specificity. *J Mol Biol*, *330*, 651-656
- Yin, J., Mundorff, E.C., Yang, P.L., Wendt, K.U., Hanway, D., Stevens, R. and Schultz, P.G. (2001) A comparative analysis of the immunological evolution of antibody 28B4. *Biochemistry*, *40*, 10764-10773
- Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbühl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., Plückthun, A. (2004) Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide binding scFv antibody with low picomolar affinity. *J Biol Chem*, *279*, 18870-7

Danksagung

Für die vorliegende Arbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Proteinstrukturforschung am Institut für Biochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt:

- Wolfgang Höhne für das Thema der Arbeit und seine Betreuung,
- Norbert Krauß für die Bereitstellung der Kristallstrukturdaten des 9E10-Fab,
- Christa Scholz und Dina Reinhardt für die Unterstützung bei der Proteinreinigung,
- Cordulla Petter und Gerd Hansen für die Peptidspotsynthesen,
- Peter Henklein für die Peptidsynthesen,
- Gabriele Küttner für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen,
- Helga Wessner und Elke Gießmann für Diskussionen und praktische Hinweise,
- Christiane Landgraf vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Einweisung in die Arbeiten an der Biacore und dem Lumineszenzimager
- und Arne Skerra von der TU-München für die Bereitstellung des Vektors pASK85.

Ich danke Una Griebel für die unterstützenden Arbeiten zum 9E10-Antikörper.

Eidestattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 10.07.2006

Kristina Zubow

Publikationsliste

Vorträge

- 1.) " Bacterial expression and characterisation of the Fab fragment of an anti-idiotypic antibody with acetylcholinesterase activity " auf dem deutsch-schwedischen Workshop " Novel recognition systems for analytical biochemistry " in Luckenwalde, 8. Dezember 2001
- 2.) " Affinitätsreifung des anti-c-myc-Antikörpers 9E10 " auf dem Institutstag der Biochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in Berlin, 29. - 30. September 2005
- 3.) " Mini-Evolution von β -Faltblattstrukturen – die Affinitätsreifung des anti-c-myc-Antikörpers 9E10 " auf dem Workshop der Forschergruppe " Bildung und Stabilität von β - Faltblättern " (475) in Dabendorf, 14. - 15. Oktober 2005

Poster

- 1.) " Design, recombinant expression and characterisation of mutants of anti-c-myc antibody 9E10 Fab fragments based on germline gene amino acid substitutions in the variable regions " auf dem Workshop des Graduiertenkollegs " Modellstudien und molekulare Modelle " in Berlin, 6. - 7. Dezember 2002
- 2.) " Preliminary insights into the evolution of the high affinity anti-c-myc-peptide antibody 9E10 showing an unusual CDR-H3 " auf dem Symposium " Formation and stability of β - sheets " in Berlin, 14. - 16. Oktober 2004
- 3.) 3) " Crystal structure and insights into the maturation of the high affinity anti-human-c-myc- peptide antibody 9E10 showing an unusual CDR-H3 " auf der Murnau Konferenz" Structural biology of molecular recognition " in Murnau, 15. - 17. September 2005